

Einfluss posttranslationaler Modifikationen auf die Funktion des Prototyp Foamy Virus Hüllproteins

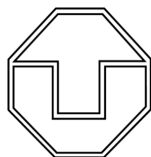
Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden
von

Daniel Lüftenegger
geboren am 26. März 1976 in Erlangen

Gutachter: PD Dr. Dirk Lindemann
Prof. Dr. Gerold Barth
Prof. Dr. Thomas Pietschmann



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DRESDEN

Danksagung

Besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Dirk Lindemann, in dessen Labor diese Arbeit angefertigt wurde. Ich bedanke mich an dieser Stelle für die stets bereitwillige Unterstützung, sowie für die langen und fruchtbaren Diskussionen, die diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht haben.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gerold Barth für sein Interesse an dieser Arbeit und für seine Bereitschaft, die vorliegende Dissertation zu begutachten.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Thomas Pietschmann für die externe Begutachtung.

Natürlich gilt ganz besonderer Dank der kompletten Arbeitsgruppe Lindemann am Institut für Virologie. Vor allem möchte ich Herrn Dr. Marc Cartellieri und Frau Dipl. Biol. Annett Stange für immerwährende Diskussionen, Anregungen und Kritiken danken.

Danke natürlich auch meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben.

Daniel Lüftenegger.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	7
1.1	Retroviren.....	7
1.1.1	Geschichte und Taxonomie.....	7
1.1.2	Morphologie und Genomorganisation der Orthoretroviren	9
1.1.3	Replikation der Orthoretroviren	13
1.2	Spumaretroviren / Foamyviren	15
1.2.1	Struktur, Genomorganisation und Genexpression.....	16
1.2.2	Die Proteine der Foamyviren.....	18
1.2.3	Replikation der Foamyviren.....	19
1.3	Das Foamyvirus Env Glykoprotein	21
1.3.1	Formen des PFV Hüllproteins Env	22
1.3.2	Eigenschaften und Domänen des FV Hüllproteins	22
1.3.2.1	Das FV Leaderpeptid (gp18 ^{LP})	24
1.3.2.2	Die Oberflächenuntereinheit (gp80 ^{SU})	25
1.3.2.3	Die Transmembranuntereinheit (gp48 TM)	25
1.4	Posttranslationale Modifikationen von Membranproteinen	27
1.4.1	N-Glykosylierung	27
1.4.2	Ubiquitinierung	30
1.5	Foamyviren und subvirale Partikel.....	35
1.6	Ziele der Arbeit	37
2	Material und Methoden	38
2.1	Verwendete Materialien.....	38
2.1.1	Chemikalien.....	38
2.1.2	Enzyme und Reaktionspuffer	38
2.1.3	Größen- und Längenstandards	38
2.1.4	Antibiotika.....	38
2.1.5	Bakterienstämme	39
2.1.6	Zelllinien	39
2.1.7	Antikörper/Antiseren.....	39
2.1.8	Oligonukleotide.....	40
2.1.9	Plasmide	43
2.1.9.1	Vorhandene Plasmide.....	43
2.1.9.2	Hergestellte Plasmide	46
2.1.10	Kommerzielle Methodenkits.....	48
2.1.11	Sonstige Materialien	48
2.2	Puffer und Lösungen	49
2.2.1	Kulturmedien und Lösungen für die Bakterienkultur.....	49
2.2.2	Kulturmedien und Lösungen für die Zellkultur	49
2.2.3	Puffer und Lösungen zur Analyse und Klonierung von DNA	51
2.2.4	Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden	52
2.2.5	Puffer und Lösungen für die konfokale Lasermikroskopie.....	54
2.3	Molekularbiologische Methoden	54
2.3.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	54

2.3.2	Restriktionsverdau von DNA	55
2.3.3	Dephosphorylierung von DNA Fragmenten.....	56
2.3.4	Agarosegelelektrophorese	56
2.3.5	Isolation von DNA Fragmenten aus Agarosegelen.....	57
2.3.6	Ligation von DNA Fragmenten	57
2.3.7	Transformation von DNA in kompetente <i>E.coli</i> Bakterien.....	57
2.3.7.1	„Standard-Transformation“	58
2.3.7.2	„Quick-Transformation“	58
2.3.8	Plasmidextraktion aus Bakterien mittels alkalischer Lyse	58
2.3.8.1	Mini-Präparation	58
2.3.8.2	Midi-Präparation	59
2.3.9	Phenol-Chloroform Extraktion von Plasmid DNA	59
2.3.10	Spektrometrische Bestimmung der DNA Konzentration	59
2.3.11	DNA Sequenzierung	60
2.4	Zellbiologische Methoden.....	61
2.4.1	Kultivierung eukaryotischer Zelllinien	61
2.4.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	61
2.4.3	Transfektion.....	61
2.4.3.1	CaPO ₄ -Transfektion	62
2.4.3.2	Polythylenimin- (PEI) Transfektion	62
2.4.3.3	FugeneHD-Transfektion	63
2.4.4	Na-Butyrat Induktion.....	64
2.4.5	Milde Lyse eukaryotischer Zellen	64
2.4.6	Durchflußzytometrie (FACS-Analyse)	64
2.4.7	Histochemische β -Galactosidase Färbung.....	65
2.5	Virologische Methoden	65
2.5.1	Das retrovirale Vektorsystem	65
2.5.2	Herstellung zellfreier viraler Überstände	66
2.5.3	Die „Freeze-and-Thaw“-Methode	66
2.5.4	Infektion eukaryotischer Zellen.....	67
2.5.5	Temperatursensitivitätstest.....	67
2.5.6	Viruspartikelpräparation	67
2.6	Proteinbiochemische Methoden	68
2.6.1	Trizin-SDS-Polyacryamidgelelektrophorese	68
2.6.2	Western Blot.....	69
2.6.3	Immunologischer Nachweis.....	69
2.6.4	Detektion	70
2.6.5	„Strippen“ eines Western Blots	70
2.6.6	Quantifizieren eines Western Blots	70
2.6.7	Oberflächenbiotinylierung von Proteinen.....	70
2.6.7.1	Radioaktive Oberflächenbiotinylierung	71
2.6.7.2	Nicht-radioaktive Oberflächenbiotinylierung	72
2.7	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	72
2.7.1	Zellkultur und Transfektion	73

2.7.2	Antikörperfärbung der Zellen (Immunofluoreszenz)	74
2.7.3	Färbung von Zellen mit Eigenfluoreszenz	74
3	Ergebnisse.....	75
3.1	Analyse des N-Glykosylierungsmusters von PFV Env	75
3.1.1	Oberflächenbiotinylierung der phänotypischen NGS-Mutanten.....	78
3.1.2	Klonierung neuer NGS-Mutanten	80
3.1.3	Biochemische Analyse der neuen NGS-Mutanten	82
3.1.4	Infektionsanalysen.....	84
3.1.4.1	Analyse der Infektiosität mittels Durchflusszytometrie (FACS).....	84
3.1.4.2	LacZ-Titration	86
3.1.5	Temperatursensitivitätstest.....	87
3.2	Ubiquitin als Regulator der PFV Partikelfreisetzung	89
3.2.1	Klonierung und biochemische Analyse der Env/Ubi-Fusionsproteine .	91
3.2.1.1	Klonierung von Env/Ubi-Fusionsproteinen	91
3.2.1.2	Biochemische Analyse	93
3.2.1.3	Klonierung weiterer Env/Ubi Fusionskonstrukte.....	95
3.2.1.4	Biochemische Analyse aller Env/Ubi Fusionskonstrukte	96
3.2.2	Infektionsanalyse der Env/Ubi Fusionskonstrukte	99
3.2.3	Klonierung und biochemische Analyse von Lysin- Mutanten	102
3.2.3.1	Klonierung der Lysin-Mutanten	102
3.2.3.2	Biochemische Analyse	104
3.2.3.3	Klonierung weiterer Lysin-Mutanten	106
3.2.3.4	Biochemische Analyse aller Lysin-Mutanten	108
3.2.3.5	Virale Partikelfreisetzung.....	110
3.2.4	Infektionsanalyse der Lysin-Mutanten	113
3.2.5	Oberflächenbiotinylierung ausgewählter Lysin-Mutanten	114
3.3	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	118
3.3.1	Immunofluoreszenz mit PFV Env-spezifischen Antikörpern	118
3.3.2	Zeitverlaufsversuch zur besseren Env-Detektion in transfizierten Zellen	119
3.3.3	Immunofluoreszenzanalysen fluorochrom-gekoppelter PFV Hüll- proteine	122
3.3.4	Zeitverlaufsexperiment zur Detektion der Cherry-markierten Env- Proteine	124
3.3.5	Kolokalisationsuntersuchungen mit zellulären Kompartiment- markern	125
3.3.5.1	Kotransfektion der Cherry-Env Konstrukte mit VLP18-GFP	126
3.3.5.2	Kotransfektion der Cherry-Env Konstrukte mit pGolgi-YFP.....	128
3.3.5.3	Kotransfektion der Cherry-Env Konstrukte mit Rab5-GFP und Rab7-YFP	130
3.3.6	Kolokalisationsuntersuchungen mit PFV Gag	133
4	Diskussion	136
5	Zusammenfassung	158
6	Literatur	160

7	Anhang	179
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	179
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	181
7.3	Tabellenverzeichnis.....	182
7.4	Erklärung	183
7.5	Lebenslauf.....	184
7.6	Publikationen.....	185

1 Einleitung

1.1 Retroviren

1970 wurde von Achong und Kollegen (Achong et al., 1971) eine Studie mit primären Zellen eines Nasopharynx-Karzinoms zum Nachweis von Epstein-Barr Virus (EBV) durchgeführt, welches im Verdacht stand, direkt mit der Induktion dieser Tumoren assoziiert zu sein. Die Tumorproben stammten von einem kenianischen Patienten und wurden in Bristol (England) in Kultur genommen. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden jedoch Strukturen gefunden, die nicht erklärbar erschienen. Es handelte sich um partikuläre Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 45nm, die aus einem elektronendichten Ring mit einem etwas weniger dichten Inneren bestanden. Diese Partikel waren nur im Zytoplasma zu finden, wo sie einzeln oder in kleinen Aggregaten vorlagen. Ähnliche Partikel waren einige Monate vorher in bovinen Lymphosarkomen (Malmquist et al., 1969) und felines Fibrosarkomen (McKissik und Lamont, 1970) gefunden worden. Diese Partikel schienen über zelluläre Membranen zu knospen und im ausgereiften Zustand einen Durchmesser von 105nm zu haben. Besonders auffallend bei diesen, bis dahin nicht klassifizierten, Viren waren große, filamentöse Strukturen auf deren Oberfläche, sowie die Eigenschaft in infizierten Zellen die Fusion zu vielkernigen Riesenzellen (Synzytia) zu induzieren. Auch diese von Achong (Achong et al., 1971) entdeckten viralen Partikel schienen sich an der Plasmamembran, vor allem aber an Membranen intrazellulärer Vakuolen zu konzentrieren und über diese zu knospen, wobei in die Membranen am Ort der Partikelknospung Proteinstrukturen von 13nm Länge eingelagert waren. Die sich zumeist in intrazelluläre Vakuolen abschnürenden Partikel hatten im ausgereiften Stadium eine Größe von ca. 110nm und waren ebenfalls zur Induktion von Synzytia in der Lage. Ähnliche Viren waren in menschlichen Proben bis zu diesem Zeitpunkt noch nie beschrieben worden. So kamen Achong et al. zu dem Schluß, dass diese Partikel, zusammen mit denen von Malmquist und McKissik entdeckten Viren, in keine bislang bekannte morphologische Virusfamilie einzuordnen waren und somit eine völlig neue Virusgruppe darstellten, in welche auch die von Rustigian (Rustigian et al., 1955) und Enders und Peebles (Enders und Peebles, 1954) beschriebenen „Simian Foamy Viruses“ einzuordnen wären. Tatsächlich stellte sich heraus dass diese, später als Prototyp Foamy Virus (PFV) bezeichneten Viren, die ersten Retroviren waren, die in menschlichem Gewebematerial identifiziert und aus diesem isoliert werden konnten. Seitdem ist die Anzahl bekannter Retroviren, sowohl humanpathogener wie auch tierpathogener, beträchtlich gestiegen und sie bilden eine eigene Virusfamilie.

1.1.1 Geschichte und Taxonomie

Retroviren sind erstmals vor ca. 100 Jahren als nicht filtrierbares Agens von Ellermann und Bang (Ellermann und Bang, 1908), sowie von Peyton Rous (Rous, 1911) beschrieben worden. Rous konnte mit ultrafiltrierten Extrakten aus Geflügelsarkomen diese Tumorerkrankungen auf gesunde Hühner übertragen und erhielt für diese Arbeiten 1966 den Nobelpreis. Mit einem weiteren Nobelpreis wurden Howard Temin und David Baltimore für die Entdeckung der Reversen Transkriptase ausgezeichnet. Bereits 1963 berichtete Temin, ebenso wie Bader (1965) von einer Sensitivität des Rous Sarkom Virus gegen Inhibitoren der

DNA-Synthese und der DNA-abhängigen RNA-Synthese während der Replikation. Die Reverse Transkriptase, welche der Virusfamilie ihren Namen verleiht, brach dann das zentrale Dogma des unidirektionalen genetischen Informationsflusses von DNA auf RNA und weiter auf die Aminosäuresequenzabfolge von Proteinen. Die Reverse Transkriptase ist in der Lage, RNA in DNA umzuschreiben und somit den genetischen Informationsfluß umzukehren (Baltimore, 1970; Temin und Mizutani, 1970). Diese retrograde Umschreibung des RNA Genoms in DNA ist eines der Hauptmerkmale dieser Virusgruppe, wenngleich später eine reverse Transkription auch für Hepadnaviren (Summers und Mason, 1982), Ty-Elemente bei Hefe (Boeke und Corces, 1989) und als Teilfunktion des Ribonukleoproteins Telomerase (Zakian, 1995) beschrieben wurde. Eine weitere, für diese Virusfamilie typische, Eigenschaft ist die für eine Infektion obligate Integration des Virusgenoms in das Genom der Zielzelle durch das viruseigene Enzym Integrase (Brown, 1997).

Besondere Bedeutung gewann die Familie der Retroviren durch die humanpathogenen Vertreter HTLV-1 und HIV. HTLV-1 ist als erstes komplexes Retrovirus mit onkogenem Potential ohne eigenes Onkogen beschrieben worden (Poiesz et al., 1980; Gallo et al., 1984). Es induziert über einen viruseigenen Transaktivator eine T-Zell Leukämie und spielt gesundheitspolitisch eine große Rolle in Japan und in der Karibik (Sodroski et al., 1984; Feuer und Chen, 1992). Der bekannteste Vertreter einer weiteren Gruppe von Orthoretroviren, den Lentiviren, ist das die Immunschwäche AIDS auslösende HI-Virus (Barre-Sinoussi et al., 1983; Coffin et al., 1986). Viele Vertreter der Gruppe der Lentiviren lösen langsam fortschreitende inflammatorische und degenerative Krankheiten aus (Übersicht in Rosenberg und Jolicoeur, 1997) und beziehen daher ihren Namen (lat. lentus=langsam).

Neben den humanpathogenen Vertretern erstreckt sich das Wirtsspektrum der Retroviren über weitere Vertebraten bis zu Invertebraten, wobei es jedoch für die einzelnen Virusspezies meist sehr begrenzt ist.

Nach der momentan aktuellen Taxonomie unterteilt man die Familie der *Retroviridae* in zwei Unterfamilien, die *Orthoretrovirinae* und die *Spumaretrovirinae*. Diese basiert auf gemeinsamen taxonomischen Charakteristika wie beispielsweise der Struktur der Viruspartikel, der Genomorganisation und der Replikation der Viren (Tab.1). Die Unterfamilie der *Orthoretrovirinae* umfasst sechs Gattungen, wohingegen die Unterfamilie der *Spumaretrovirinae* als einzige Gattung die Foamyviren enthält. Des Weiteren wird bei den Orthoretroviren zwischen einfachen und komplexen Vertretern unterschieden, die sich hinsichtlich ihrer Genomstruktur voneinander unterscheiden. Das Genom der einfachen Retroviren kodiert ausschließlich für die für Retroviren spezifischen Gene *gag*, *pol* und *env*, wohingegen komplexe Retroviren noch über akzessorische Gene für Proteine mit meist regulatorischer Funktion verfügen (Vogt, 1997a). In Tabelle 1 sind wichtige Vertreter ihrer jeweiligen Gattung mit den entsprechenden Genomstrukturen aufgeführt.

Neben den bisher besprochenen, so genannten, exogenen Retroviren sind in den Genomen zahlreicher Vertebraten endogene retrovirale Gensequenzen nachweisbar. Sie sind in allen Zellen eines Organismus integriert, stammen meist von einfachen Retroviren ab, und werden stabil über die Keimbahn übertragen. Diese endogenen Retroviren können unter bestimmten Umständen, beispielsweise durch Strahlung oder demethylierende Reagenzien reaktiviert werden (Rowe et al., 1971), oder auch spontan erneut die Bildung viraler Partikel

aufweisen (Pincus, 1980). Meist jedoch sind sie soweit degeneriert, dass sie nur noch durch die das Genom flankierenden LTRs als virale Sequenzen zu erkennen sind.

Tabelle 1: Klassifizierung der Familie der *Retrovirinae* (nach Fauquet et al., 2005)

Unterfamilie	Gattung	Wichtige Vertreter	Genom	Virusmorphologie
Orthoretrovirinae	α -Retroviren	Rous Sarkoma Virus (RSV) Avian Leukosis Virus (ALV)	einfach	zentral liegende, sphärische Kapside. „C-Typ“
	β -Retroviren	Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV) Mason-Pfizer Monkey Virus (MPMV)	einfach	exzentrisch liegende, sphärische „B-Typ“ (MMTV), oder zylindrische „D-Typ“ Kapside (MPMV)
	γ -Retroviren	Murine Leukemia Virus (MuLV) Feline Leukemia Virus (FeLV)	einfach	zentral liegende, sphärische Kapside. „C-Typ“
	δ -Retroviren	Human T-Cell Leukemia Virus (HTLV) Bovine Leukemia Virus (BLV)	komplex	zentral liegende, sphärische Kapside. „C-Typ“
	ϵ -Retroviren	Walleye Dermal Sarcoma Virus (WDSV)	komplex	zentral liegende, sphärische Kapside. „C-Typ“
	Lentiviren	Human Immunodeficiency Virus (HIV) Simian Immunodeficiency Virus (SIV)	komplex	konusförmige Kapside
	Foamyviren	Prototype Foamy Virus (PFV) Feline Foamy Virus (FeFV)	komplex	zentral liegende, sphärische Kapside. „C-Typ“
Spumaretrovirinae				

Die Unterfamilie der *Spumaretrovirinae* unterscheidet sich hinsichtlich ihrer replikativen Strategie und ihrer Genomstruktur deutlich von den *Orthoretrovirinae*. Aus diesem Grund werden in den folgenden Abschnitten die für alle Orthoretroviren gültigen Eigenschaften bezüglich des Genomaufbaus, der viralen Proteine und des Replikationszyklusses besprochen. Die Foamyviren werden anschließend in einem gesonderten Kapitel genauer beschrieben.

1.1.2 Morphologie und Genomorganisation der Orthoretroviren

Retroviren sind sphärische, mit einer Lipidmembran umhüllte Viruspartikel mit einem Durchmesser von 80-120nm und einer mittleren Dichte von 1,16g/ml (Abb.1) (Coffin, 1997; Übersicht in Swanstrom et al., 1997). Die Lipidmembran ist von der Plasmamembran der Wirtszelle abgeleitet, wenngleich sie mehr Sphingomyeline und Cholesterin enthält (Quigley et al., 1971; Aloia et al., 1993). In der Lipidmembran verankert befindet sich das, in einem

trimeren Komplex vorliegende, virale Hüllprotein (Env) (Chan et al., 1998), über welches die Erkennung und Bindung des Virus an den entsprechenden Rezeptor auf der Zielzelle erfolgt. Im Inneren des Viruspartikels liegt zwischen der Virushülle und dem Kapsid das Matrix-Protein (MA) mit der Membran assoziiert vor, ohne in diese eingelagert zu sein. Das Kapsid besteht aus Monomeren des Kapsidproteins (CA) und bildet eine kugel- oder konusförmige elektronendichte Proteinhülle, die das virale RNA-Genom beherbergt. Dieses besteht aus zwei einzelsträngigen (+)-Strang RNA-Molekülen, die an ihrem 5'-Ende miteinander verbunden sind (Billeter et al., 1974; Kung et al., 1976). Die genomische RNA wird durch die Bindung von Nukleokapsidproteinen an diese stabilisiert (Davis und Rueckert, 1972). Neben den Strukturproteinen findet man in Viruspartikeln weitere virale sowie zelluläre Proteine. Die Proteine Protease (PR), Integrase (IN) und Reverse Transkriptase (RT), alles Produkte des *pol*-Gens, sind nachweisbar, sowie bei komplexen Retroviren Produkte akzessorischer Gene. Weiterhin sind zelluläre Proteine wie beispielsweise Cyclophilin A und Ubiquitin identifiziert worden (Coffin, 1997).

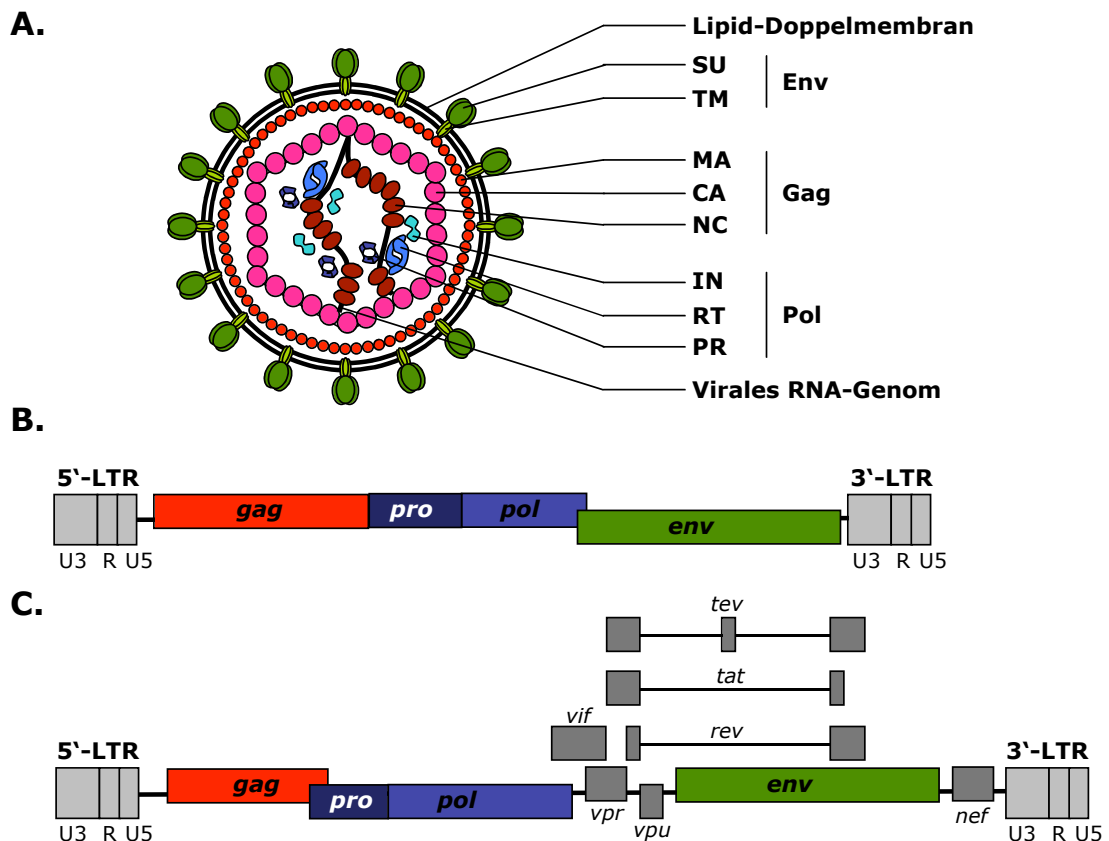


Abbildung 1: Struktur und Genomorganisation von Retroviren

(A): Schematische Darstellung eines Retroviruspartikels (Verändert nach Coffin, 1997). Die prozessierten Untereinheiten der drei retroviralen Genprodukte Gag, Pol und Env sind farblich voneinander abgehoben. Die Farbkodierung ist in (B) und (C) beibehalten. **(B):** Generalisiertes Provirusgenom eines einfachen Retrovirus. **(C):** Darstellung eines integrierten proviralen Genoms eines komplexen Retrovirus (HIV-1) (Verändert nach Modrow, 2003). SU: Oberflächenuntereinheit; TM: Transmembranuntereinheit; MA: Matrixprotein; CA: Kapsidprotein; NC: Nukleokapsidprotein; IN: Integrase; RT: Reverse Transkriptase; PR: Protease; LTR: „long terminal repeat“; U3: einzigartige 3'-Region; U5: einzigartige 5'-Region; R: redundante Region.

Das aus einer einzelsträngigen RNA bestehende retrovirale Genom besitzt durch eine 5' gelegene Cap-Struktur, sowie eine Poly-Adenylierung am 3'-Ende, alle Eigenschaften einer

eukaryotischen mRNA (Abb.2) (Übersichten in Modrow und Falke, 2003; Vogt, 1997b). Die Größe des Genoms ist relativ variabel und reicht von ca. 7000bp bei MLV, welches das erste entschlüsselte Retrovirusgenom überhaupt darstellt (Shinnick et al., 1981), bis zu ca. 13000bp bei Spumaretroviren. Die RNA enthält kodierende Sequenzen für die viralen Gene *gag*, *pol* und *env*, die von regulatorischen Bereichen flankiert werden.

Eine als R-Region bezeichnete redundante Sequenzabfolge findet man sowohl am 5'-Ende, als auch am 3'-Ende einer jeden genomischen RNA (Abb.2). Sie ist je nach Virusfamilie von unterschiedlicher Länge, schließt sich 3' direkt an die Cap-Struktur an und liegt in gleicher Basenfolge und Orientierung am 3'-Ende vor. Sie enthält bei den meisten Retroviren ein Polyadenylierungssignal (Coffin, 1997). Auf die R-Region folgt im 5'-Bereich des RNA-Genoms die als U5 bezeichnete Sequenzabfolge, die für die Integration in das Genom der Zielzelle wichtige Sequenzabschnitte enthält. Anschließend folgt die Primerbindungsstelle (pbs), an welche bereits im Viruspartikel eine zelluläre tRNA gebunden vorliegt. Diese tRNA dient der Reversen Transkriptase während der Replikation des Virus als Primer für die DNA-Synthese (Verma et al., 1971). Zwischen der pbs und dem kodierenden Bereich auf der RNA liegt die so genannte „Leader-Region“. In dieser befindet sich der Spleißdonor für die Produktion aller gespleißten viralen mRNA-Moleküle, sowie das Verpackungssignal (Ψ). Dieses stellt sicher, dass die neu gebildeten retroviralen RNA-Genome während der Morphogenese durch Anlagerung an die Strukturproteine in die Viruspartikel verpackt werden. Am 3'-Ende des kodierenden Bereiches liegt der Polypurintrakt (ppt), eine Sequenzfolge von mindestens neun Adenosin- und Guanosinresten, die wichtig für die Initiation der Synthese des DNA-Doppelstranges bei der reversen Transkription ist (Modrow und Falke, 2003). Analog zur U5-Region findet man am 3'-Ende des Genoms eine U3-Region von unterschiedlicher Länge. Umfasst sie bei Lentiviren ca. 450bp, kann sie bei MMTV bis zu 1200bp umfassen (Modrow und Falke, 2003). In ihr enthalten sind die für die Expression der viralen Gene wichtigen Promotor- und Enhancerelemente, an die sich zelluläre wie auch virale Proteine binden.

Nach der reversen Transkription liegt das Virusgenom in Form von doppelsträngiger DNA vor. Die in das Wirtszellgenom integrierten Sequenzen werden als Provirus bezeichnet (Abb.2) (Vogt, 1997b). Die nun im Provirus enthaltenen LTRs bestehen aus den Regionen U3-R-U5, die für die Integration und Transkription wichtige Sequenzen enthalten und an beiden Enden in gleicher Basenfolge wie auch gleicher Orientierung vorliegen. Das Genom eines einfachen Retrovirus besteht aus drei offenen Leserastern (ORF, engl.: open reading frames), die für die Strukturproteine Gag, Pol und Env kodieren (Vogt, 1997b, Modrow und Falke, 2003).

Der *gag*-ORF (Gruppenspezifisches Antigen) kodiert für die internen Strukturkomponenten des Kapsids. Es wird als Vorläuferprotein an freien Ribosomen im Zytoplasma synthetisiert und gelangt mit Hilfe der zellulären Transportmaschinerie an den Ort der Partikelmorphogenese. Das Vorläuferprotein ist in Hinblick auf seine sequenzielle Anordnung der einzelnen Untereinheiten bei allen Orthoretroviren gleich aufgebaut (Wills und Craven, 1991). Während der Partikelreifung wird das Protein schließlich durch die viruseigene Protease in die Untereinheiten Matrix (MA), Kapsid (CA) und Nukleokapsid (NC) prozessiert (Übersicht in Swanstrom und Wills, 1997).

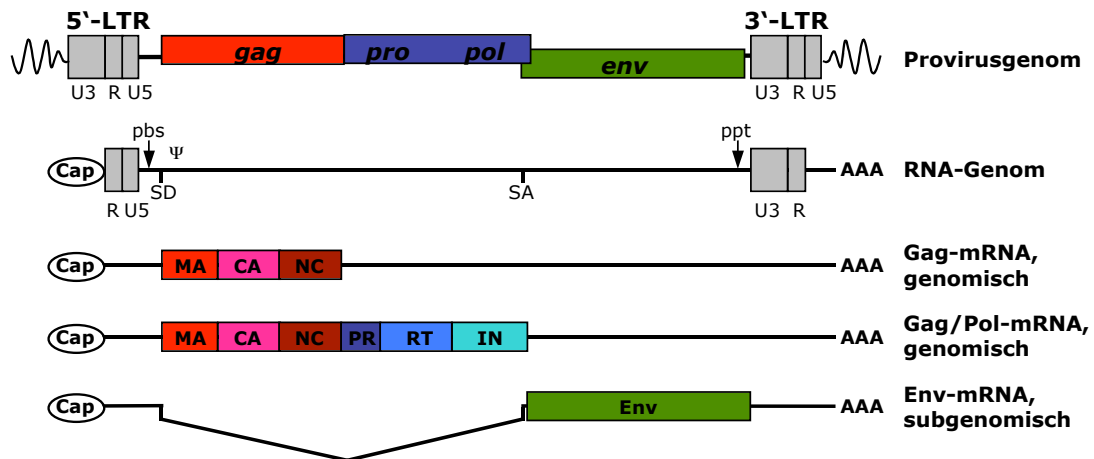


Abbildung 2: Genom und Genexpression einfacher Retroviren

Schematische Darstellung eines integrierten Provirusgenoms einfacher Retroviren. Die für Retroviren typischen Gene *gag*, *pol* und *env* sind zu beiden Seiten von „long terminal repeats“ (LTRs) flankiert. Voneinander unabhängige Genabschnitte sind in rot, blau und grün dargestellt und entsprechen der Farbkodierung aus Abb.1. Die bei der Transkription entstandenen mRNAs sind 5' gecappt und an ihrem 3'-Ende polyadenyliert. Die subgenomische mRNA für die Translation der Env-Proteine wird durch einfaches Spleißen gewonnen. LTR: „long terminale repeat; U3: einzigartige 3'-Region; U5: einzigartige 5'-Region; R: redundante Region; pbs: Primerbindungsstelle; SD: Spleiß-Donor; SA: Spleiß-Akzeptor; Ψ: Verpackungssignal; ppt: Polypurintrakt.

Die viralen Enzyme Protease (PR), Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN) werden im *pro/pol*-ORF kodiert. Auch die Produkte dieses Gens werden als Vorläuferprotein synthetisiert, wobei es sich um Fusionsproteine aus Gag und Pro/Pol handelt. Die Expression erfolgt nicht separat, sondern von einer gemeinsam genutzten genomischen RNA. Die ORFs der entsprechenden Gene können wie im Falle von MuLV in einem, oder wie bei beispielsweise MMTV oder HTLV in drei separaten Leserastern liegen. Darüber hinaus können sich auch jeweils zwei Gene ein Leseraster teilen. Dies ist bei HIV der Fall, wo *pro* und *pol* in einem Raster liegen, wohingegen bei ASLV *gag* und *pro* in einem Leseraster vereint sind (Coffin, 1997). Je nach Anordnung der Leseraster zueinander kommen für die Bildung der Fusionsproteine zwei unterschiedliche Mechanismen bei der Translation durch die Ribosomen zur Anwendung. Bei MuLV beispielsweise, wo alle ORFs sich in einem Leseraster befinden, wird das Stop-Kodon nach dem *gag*-ORF unterdrückt. Hierbei wird die Translation durch ausgeprägte Sekundärstrukturen der mRNA direkt strangabwärts des Terminationskodons verlangsamt und es kommt zu einer Falschpaarung der zellulären tRNAs. Statt die Translation zu unterbrechen wird ein Glutamin an dieser Stelle eingebaut (Yoshinaka et al., 1985). Liegen die Gene in unterschiedlichen Leserastern, erfolgt ein Wechsel des Selbigen. Bei einem Leserasterwechsel wird abermals die Translation durch Sekundärstrukturen auf der genomischen mRNA verlangsamt. Auf einer als „slippery sequence“ bezeichneten Basenabfolge wird dann das Ribosom um –1 in 5'-Richtung verschoben, und somit das Stop-Kodon ignoriert (Jacks et al., 1988; Parkin et al., 1992). Liegen wie bei HTLV drei separate Leseraster vor, erfolgt ein zweifacher Wechsel in –1 Richtung. Diese Mechanismen zur Synthese von Gag/Pro/Pol-Fusionsproteinen laufen relativ ineffizient in nur ca. 5% der Fälle ab (Jamjoom et al., 1977). Diese Rate stellt sicher, dass die enzymatischen Komponenten in richtigen stöchiometrischen Mengen in der Zelle synthetisiert und in die Viruspartikel integriert werden. Die Prozessierung in die aktiven

Untereinheiten erfolgt erst während der Virusreifung autokatalytisch durch die virale Protease (Swanstrom und Wills, 1997).

Die Env-Proteine werden von einer einfach gespleißten, subgenomischen mRNA translatiert. Die Synthese erfolgt in das Lumen des endoplasmatischen Reticulums (ER). Während des Transports an die Zelloberfläche werden die Hüllproteine beispielsweise durch Glykosylierungen modifiziert und von Furin, oder einer furin-ähnlichen Protease in ihre Untereinheiten gespalten. Die Heterodimere, bestehend aus der Oberflächen- (SU) und der Transmembranuntereinheit (TM), bilden auf der Zelloberfläche trimere Komplexe (Chan et al., 1998).

Da den retroviralen Hüllproteinen eine zentrale Stellung in dieser Arbeit zukommt, werden sie im Kapitel 1.3 eingehender besprochen.

Komplexe Retroviren besitzen weitere ORFs für akzessorische Gene, die für Proteine mit meist regulatorischer Funktion kodieren. Diese werden meist von mehrfach gespleißten mRNAs translatiert (Vogt, 1997b).

1.1.3 Replikation der Orthoretroviren

Die Beschreibung des orthoretroviralen Replikationszyklusses basiert, wenn nicht gesondert ausgewiesen, auf Modrow und Falke (S.414-425, 2003).

Der Replikationszyklus beginnt mit der Env-vermittelten Adsorption der Viruspartikel an die Zielzelle (Abb.3). Hierbei bindet die SU Untereinheit ihren spezifischen Rezeptor auf der Oberfläche der Zelle. Durch die Bindung an den Rezeptor erfährt der trimere Komplex aus SU-TM Heterodimeren konformationelle Änderungen seiner räumlichen Struktur, die zu einer Aktivierung des Fusionspeptides in der TM Untereinheit und Verschmelzung der Virus- mit der Wirtszellmembran führt. Virale Partikel können aber auch über rezeptorvermittelte Endozytose in das Zellinnere gelangen, wobei dann das Fusionspeptid durch eine Erniedrigung des pH-Wertes in den Endosomen aktiviert wird. Durch die Verschmelzung der Membranen gelangt in beiden Fällen das Viruskapsid in das Zytoplasma der infizierten Zelle (Übersicht in Hunter, 1997).

Das nun frei vorliegende Kapsid verliert seine Integrität und wird durchlässig für Nukleotide. Der im Inneren vorliegende Ribonukleoproteinkomplex ist mit der RT assoziiert und das virale RNA-Genom wird in einem mechanistisch komplexen Vorgang in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Dabei kommt es zu einem zweifachen Matrizenwechsel und einer Hydrolyse von RNA/DNA-Hybridsträngen durch die RNaseH-Aktivität der Reversen Transkriptase. Das virale DNA-Genom bleibt auch weiterhin mit verschiedenen viralen und zellulären Proteinen verbunden und wird nun als Präintegrationskomplex bezeichnet. Dieser Präintegrationskomplex ist mit 20 bis 30nm zu groß um passiv durch die Kernmembran zu gelangen, weswegen Retroviren nur sich teilende Zellen erfolgreich infizieren können wenn sich die Kernmembran während der Mitose auflöst. Eine Ausnahme bilden die Lentiviren, die für akzessorische Proteine kodieren, die einen Kernimport des Komplexes fördern (Coffin, 1997).

Im Zellkern wird das doppelsträngige DNA Genom mit Hilfe der Integrase an einer willkürlichen Stelle in das Wirtszellgenom integriert (Brown, 1997) und erhält damit den Status eines zellulären Gens (Coffin, 1997). Dies ist insofern vorteilhaft, da die virale DNA

nicht mehr verloren gehen kann, sondern bei jeder Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben wird. Darüber hinaus wird für die Expression der Virus-kodierten Proteine die zelluläre Transkriptions- und Translationsmaschinerie benutzt. Dazu sind allerdings einige cis-aktiven Promotor und Enhancer Elemente notwendig, die sich in den LTRs, vor allem in der U3-Region, befinden. Die Transkription beginnt nach dem Promotor an der Grenze zwischen U3 und R und verläuft bis zur 3' R-Region in der sich das Signal zur Polyadenylierung befindet.

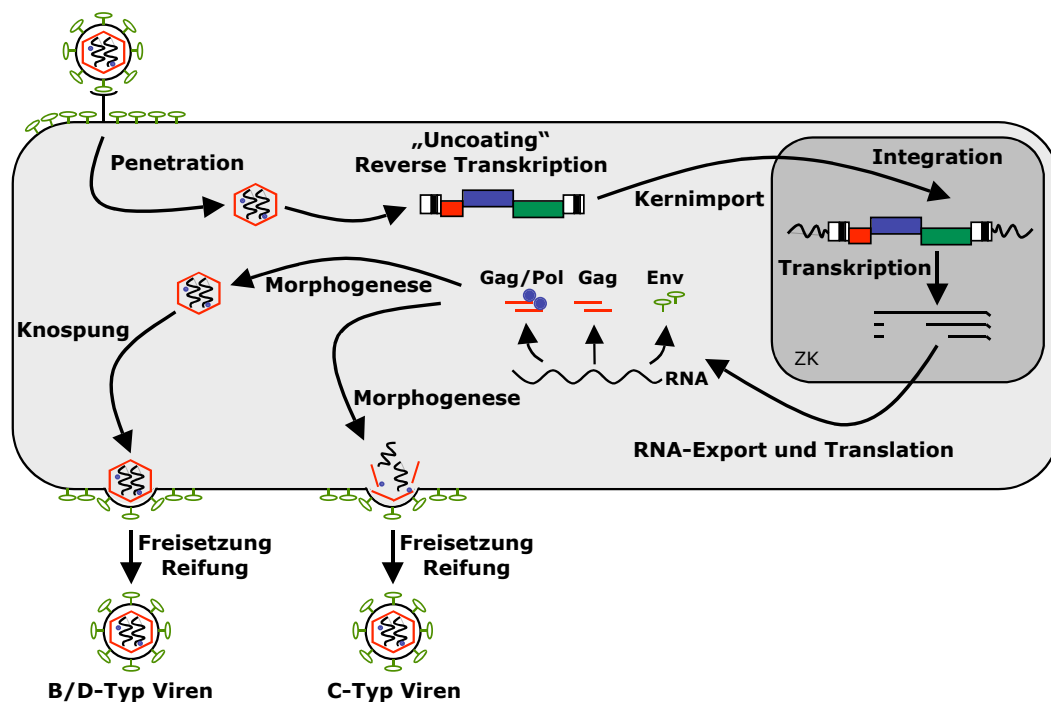


Abbildung 3: Retroviraler Replikationszyklus

Die farbliche Kodierung der Gene, bzw. Proteine entspricht den Abb.1 und 2.

Die viralen mRNAs werden genau wie zelluläre mit einer Cap-Struktur versehen und in das Zytoplasma transportiert. Dieser Transport erfolgt bei einfachen Retroviren alleine durch zelluläre Proteine, wohingegen bei komplexen Retroviren virale Proteine maßgeblich an der Steuerung des Exports beteiligt sind. Im Zytoplasma und dem ER erfolgt die Synthese der Strukturproteine, die dann in einer komplexen Morphogenese zu Viruspartikeln zusammenfinden. Die Knospung und somit die Umhüllung mit einer Membran, in welche die Env-Proteine eingelagert sind, erfolgt an der Plasmamembran. Anhand der Partikelmorphogenese können Retroviren grob in zwei Gruppen eingeteilt werden. Zum einen in die B/D-Typ Viren, die ihr Kapsid frei im Zytoplasma bilden und als fertige Kapside an Membranen dirigiert werden, über welche sie dann knospen (β -Retroviren und Spumaretroviren). Zum anderen in die C-Typ Viren, zu denen alle anderen Retroviren gehören. Bei dieser Gruppe lagern sich die Gag und Gag/Pol-Fusionsproteine an die Plasmamembran an und formen unter Einschluß der genomischen RNA Kapside. Die Reifung der Viruspartikel erfolgt nach dem Abschnüren von der infizierten Zelle durch die virale Protease, die die Gag und Gag/Pol-Vorläuferproteine in ihre aktiven Untereinheiten

prozessiert. Dieser Prozess verleiht den Viruspartikeln ihre endgültige Gestalt und Infektiosität.

1.2 Spumaretroviren / Foamyviren

Die zweite Unterfamilie der *Retroviridae* bilden neben den *Orthoretrovirinae* die *Spumaretrovirinae* oder auch Foamyviren. Diese Gruppe von komplexen Retroviren weisen in ihrer Genexpression und ihrem Replikationszyklus deutliche Unterschiede zu den Vertretern der Orthoretroviren auf, weshalb sie eine eigene Unterfamilie bilden.

Foamyviren wurden erstmals von Enders und Peebles (Enders und Peebles, 1954) und kurz darauf von Rustigian und Mitarbeitern (Rustigian et al., 1955) als „foamyvirales Agens“ beschrieben. Dieser Name ist der Eigenschaft geschuldet, dass die Vertreter dieser Gruppe in infizierten Zellkulturen die Bildung von Synzytia induzieren (Hill et al., 1999). Dieser Tatsache liegt auch die Namensgebung dieser Viren zu Grunde, da sowohl „Spuma“ (lat.) als auch „Foam“ (engl.) ins Deutsche übersetzt Schaum heißt. Die von Achong (Achong et al. 1971) isolierte Variante wurde in den darauf folgenden Jahren als das Humane Foamy Virus (HFV) bezeichnet. Sequenzanalysen ergaben jedoch, dass es sich hierbei nicht um ein eigentlich menschliches Virus handelt, sondern um ein zoonotisch auf den Menschen übertragenes Schimpansenvirus (Herchenröder et al., 1994, 1995). Die momentane Nomenklatur beschreibt dieses Virus als SFVcpz (hu) oder als Prototyp Foamy Virus (PFV), wobei letztere in dieser Arbeit Verwendung findet. Seroepidemiologische Untersuchungen haben überdies ergeben, dass der Mensch kein natürlicher Wirt für Foamyviren ist (Ali et al., 1996; Schweizer et al., 1995; Heneine et al., 2003), sondern ausschließlich zoonotisch von seropositiven Affen infiziert wird. Die Übertragung geschieht hierbei meist durch virushaltigen Speichel des infizierten Tieres oder durch kontaminiertes Blut und ist bislang mehrmals bei Tierwärtern und Angehörigen afrikanischer Jägergruppen beobachtet worden (Schweizer et al., 1997; Heneine et al., 1998; Schwitzer et al., 2004). Eine zwischenmenschliche Übertragung wurde bislang noch nicht nachgewiesen, weshalb die Infektion von Menschen auch als biologische Sackgasse beschrieben wird (Linial, 2000; Meiering und Linial, 2001). Obgleich seit der Identifikation dieser Virusgruppe viele Krankheiten im Menschen mit einer Foamyvirus Infektion assoziiert wurden, konnten diese Annahmen jedoch nie bestätigt werden (Übersicht in Meiering und Linial, 2001). Dieser apathogene Infektionsverlauf steht in einem deutlichen Kontrast zur Zytopathogenität (Vakuolisierung und Synzytiabildung) des Virus in Zellkultur. Foamyviren sind in der Lage in einem infizierten Organismus trotz hoher spezifischer Antikörpertiter zu persistieren und zeigen, ähnlich dem HTLV-1, sehr niedrige Replikationsraten (Linial, 2000; Meiering und Linial, 2001) ohne erkennbare pathologische Folgen für den natürlichen Wirt. Als natürliche Wirte dienen den Foamyviren neben Primaten auch Alt- und Neuweltaffen wie beispielsweise die afrikanische grüne Meerkatze und der Totenkopffaffe, sowie Lemuren und andere Säuger wie Katzen, Rinder und Pferde (Übersicht in Meiering und Linial, 2001).

Das breite Wirtsspektrum, sowie die Tatsache, dass es keine *in vitro* Zelllinie gibt die nicht durch Foamyviren infizierbar wäre, und deren Apathogenität *in vivo*, machen diese Virusgruppe interessant für die Entwicklung von Virusvektoren für die somatische Gentherapie (Russell und Miller, 1996; Bodem et al., 1997; Nestler et al., 1997; Lindemann

et al., 2000). Diese potentielle Anwendung hat zu einer intensiven Erforschung der Biologie von Foamyviren geführt, die in den folgenden Kapiteln kurz umrissen wird.

1.2.1 Struktur, Genomorganisation und Genexpression

Foamyviren haben einen mittleren Durchmesser von 120nm und beherbergen ein 40-50nm messendes Kapsid (Achong et al., 1971; Loh, 1993; Morozov et al., 1997). Die ermittelte Dichte der Viruspartikel liegt etwa zwischen 1,18-1,24 g/ml (Morozov et al., 1996; Cartellieri et al., 2005). In die das Kapsid umgebende Virushüllmembran sind die Hüllproteine als trimerer Komplex mit einer Größe von ca. 13nm eingebunden (Achong et al., 1971; Loh, 1993; Morozov et al., 1996). Eingelagert in das Kapsid findet man das virale Genom, welches in identischer Ausführung doppelt vorliegt. Die Genome besitzen, ähnlich wie Orthoretroviren, eine Dimerisierungsdomäne in der 5' gelegenen Leader-Region, über welche sie miteinander assoziiert sind (Erlwein et al., 1997). Die genomische RNA hat eine Länge von 11,68kB und weist die für Retroviren typischen Elemente auf. Darüber hinaus befinden sich auf ihr *cis*-aktive Elemente, CASI und CASII, die eine Rolle für die Verpackung des viralen RNA-Genoms und der Pol Proteine spielen (Heinkelein et al., 1998; 2002; Peters et al., 2005), sowie ein zweiter interner Polypurintrakt (ppt) für die (+)-Strang DNA-Synthese (Kupiec et al., 1988).

Nach der reversen Transkription hat das Provirusgenom eine Länge von 13,26kB und kodiert für die retroviralen Gene *gag*, *pol* und *env* ebenso wie für die akzessorischen Gene *bel1* und *bel2* (Übersicht in Rethwilm, 1995). Die kodierenden Sequenzabschnitte werden, wie für Retroviren typisch, von LTRs flankiert. Ungewöhnlich für Retroviren ist bei Foamyviren die Existenz eines zweiten Promotors, dem so genannten internen Promotor (IP) in der Region des *env*-Gens (Löchelt et al., 1993; 1995). Dieser ist für eine stabile Genexpression in den infizierten Zellen unbedingt notwendig. Während der LTR Promotor in Abwesenheit eines Transaktivators stumm ist (Rethwilm et al., 1991; Keller et al., 1991), zeigt der IP eine geringe Basalaktivität, die zur Expression des foamyvirealen Transaktivators Tas führt (Campbell et al., 1994; Löchelt et al., 1994). Tas übt seine aktivierende Wirkung dann sowohl auf den IP als auch auf den LTR Promotor durch direkte Bindung an die Provirus-DNA aus (Linial, 1999). Nach einer Integration in das Wirtszellgenom wird durch die Basalaktivität des IP über eine subgenomische mRNA Tas exprimiert, welches wiederum mit hoher Affinität den IP stimuliert (Kang et al., 1998), wodurch eine weitere Verstärkung der Expression von Tas erreicht wird. Liegt Tas in ausreichend hoher Konzentration vor, stimuliert es schließlich den U3 Promotor im FV LTR, was zu einer Transkription von ungespleißten genomischen, und einfach gespleißten mRNAs für die strukturellen Proteine führt (Abb.4) (Übersicht in Löchelt, 2003).

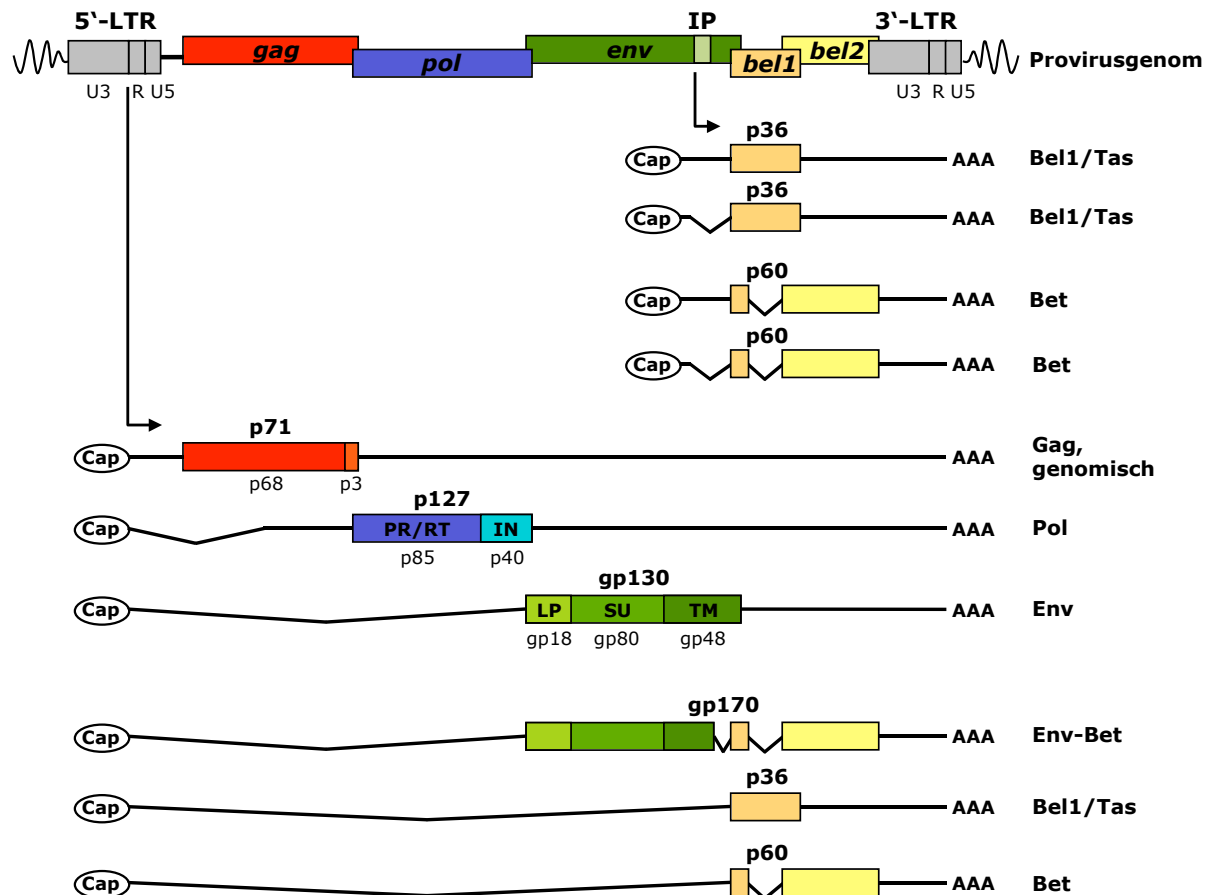


Abbildung 4: Genomorganisation und Genexpression der Foamyviren

Schematische Darstellung der Genomorganisation eines integrierten Foamyvirus. Der kodierende Bereich wird beiderseits von einem LTR flankiert, die jeweils in gleicher Orientierung vorliegen. Die voneinander unabhängigen ORFs sind durch separate Rechtecke gekennzeichnet. Neben dem LTR U3 Promotor enthält das PFV Genom noch einen weiteren, internen Promotor im Bereich des *env*-Gens. Beide Promotoren werden durch den Transaktivator Tas stimuliert. Die verschiedenen Transkripte werden jeweils 5' mit einer Cap-Struktur und 3' mit einem Poly-A-Schwanz versehen. Die Molekulargewichte, Bezeichnungen und Spaltprodukte der Proteine sind angegeben. PR/RT: Protease/Reverse Transkriptase mit RNaseH Aktivität; IN: Integrase; LP: Leaderpeptid; SU: Oberflächenuntereinheit; TM: Transmembranuntereinheit; LTR: „Long Terminal Repeat“; U3: einzigartige 3'-Region; R: R-Region; U5: einzigartige 5'-Region.

Eine weitere Besonderheit der Foamyviren ist die von Gag unabhängige Pol-Expression (Yu et al., 1996; Enssle et al., 1996; Jordan et al., 1996). Während bei Orthoretroviren die Pol-Expression von der Bildung eines Gag/Pol-Fusionsproteins abhängig ist, tragen Foamyviren einen Spleißakzeptor ca. 500bp vor dem *pol*-Transkriptionsstart, im Bereich des *gag*-Gens, für die Synthese separat gespleißter *pol*-mRNAs (Yu et al., 1996). Dadurch entfallen die sonst für Retroviren üblichen Kontrollmechanismen wie ein ribosomaler Leserasterwechsel oder die Terminationsunterdrückung. In dieser Hinsicht ähneln Foamyviren den Hepadnaviren, da diese ihre Polymerase, das P-Protein, ebenfalls über eine separat gespleißte mRNA synthetisieren (Loeb und Ganem, 1993). Da aber Orthoretroviren durch die Bildung eines solchen Gag/Pol-Fusionsproteins sicherstellen das Pol in ausreichenden Mengen in das entstehende Virion inkorporiert wird, müssen Foamyviren einen alternativen Weg dafür gefunden haben. Hierbei fungiert die gebildete genomische RNA als „Brückenmolekül“. Zum Einen wird sie über die „pol encapsidation sequences“

(PES) spezifisch von den Pol Proteinen gebunden, zum Anderen vermittelt die Bindung von Gag über die GR-Boxen an die CASI und CASII Sequenzen der genomischen RNA den Einbau in die entstehenden Viruspartikel (Heinkelein et al., 1998; 2002; Peters et al., 2005).

1.2.2 Die Proteine der Foamyviren

Das Gag Protein der Foamyviren wird von einer ungespleißten, genomischen mRNA synthetisiert und hat als Vorläuferprotein eine Größe von 71kDa ($p71^{\text{Gag}}$). Es unterscheidet sich von den Gag-Proteinen der Orthoretroviren hinsichtlich seiner Domänenorganisation und Prozessierung. Der wohl auffälligste Unterschied ist die fehlende Prozessierung in die sonst üblichen Untereinheiten MA, CA und NC. Stattdessen wird ausschließlich am C-Terminus ein 3kDa großes Protein ($p3^{\text{Gag}}$) durch die virale Protease abgespalten (Giron et al., 1997). Dieser Spaltvorgang ist absolut notwendig für die Bildung infektiöser Partikel (Konvalinka et al., 1995; Enssle et al., 1997; Zemba et al., 1998), in welchen man beide Proteinvarianten in äquimolaren Mengenverhältnissen nachweisen kann (Netzer et al., 1990). Eine unter den Retroviren hoch konservierte, so genannte „Major Homology Region“ (MHR) in der CA Untereinheit fehlt bei Foamyviren (Renne et al., 1992) genauso wie die Cys-His Boxen. Diese spielen eine wichtige Rolle bei der Erkennung des retroviralen Verpackungssignals auf der genomischen mRNA (Berkowitz et al., 1996). Jene Proteindomänen werden bei Foamyviren funktionell durch Glyzin-Arginin reiche Sequenzabschnitte (GR-Boxen I-III) ersetzt (Schliephake und Rethwilm, 1994). Während die GRI-Box zuständig für die Bindung von Nukleinsäuren ist (Yu et al., 1996), befindet sich in der GRII-Box ein Kernlokalisationssignal (NLS), welches eine zeitabhängige Translokation der Gag Proteine in den Kern bewirkt (Schliephake und Rethwilm et al., 1994). Die biologische Funktion des Kerntransportes während des Replikationszyklusses ist bislang nicht geklärt. Die fehlende Prozessierung des Gag Proteins, sowie die Anwesenheit der GR-Boxen erinnert an das Core Protein der Hepadnaviren, das ebenfalls über Glyzin-Arginin reiche Sequenzabschnitte RNA sowie DNA zu binden vermag (Nassal et al., 1992; Cristofari et al., 2000). Als weitere funktionelle Domänen wurden ein „Coiled-Coil“ Motiv, das wahrscheinlich eine Gag/Gag-Interaktion während der Partikelmorphogenese ermöglicht (Tobaly-Tapiero et al., 2000), sowie ein „Cytoplasmic Targeting-Retention Signal“ (Eastman und Linial, 2001) identifiziert. Letzteres bedingt den Ort der Partikelmorphogenese und ist unabdingbar für den Zusammenbau der Kapside (Lehmann-Che et al., 2007; Eastman und Linial, 2001; Sfakianos und Hunter, 2003).

Die Translation des Pol-Vorläuferproteins erfolgt, wie bereits erwähnt, von einer einfach gespleißten mRNA und mündet in einem 127kDa Fusionsprotein ($p127^{\text{Pol}}$), das aus den Untereinheiten PR, RT und IN besteht. Die autokatalytische Spaltung findet wahrscheinlich während oder nach der Morphogenese in die funktionellen Domänen Protease/Reverse Transkriptase mit RNase Aktivität ($p85^{\text{PR/RT}}$) und Integrase ($p40^{\text{IN}}$) statt (Netzer et al., 1990; Pfrepper et al., 1999). Während die Spaltung zwischen RT und IN für die Replikation essentiell ist (Baldwin et al., 1999), konnte eine Prozessierung zwischen den Untereinheiten der PR und der RT bislang nicht nachgewiesen werden, genauso wenig wie eine singuläre RNaseH (Kögel et al., 1995). Die foamyvirale Protease gehört wie alle anderen retroviralen Proteasen auch zur Familie der Aspartat-Proteinasen und ist nur in Form eines Homodimers

aktiv (Pfrepper et al., 1998). Im Gegensatz zu den Proteasen der Orthoretroviren trägt sie in ihrem aktiven Zentrum ein Glutamin an Stelle eines Glyzins (Flügel und Pfrepper, 2003). Für die Bildung infektiöser Partikel sind sowohl eine aktive Protease, als auch aktive Formen der Reversen Transkriptase und der Integrase notwendig (Konvalinka et al., 1995; Enssle et al., 1999; Meiering et al., 2000). Sowohl in der RT/RNaseH, als auch in der IN Untereinheit findet man jeweils ein NLS, wobei letzteres für den Kernimport des Präintegrationskomplexes notwendig ist (Imrich et al., 2000).

Das Hüllprotein Env stellt das dritte für alle Retroviren gemeinsame Protein dar. Da diesem Protein jedoch eine besondere Stelle in dieser Arbeit zukommt, wird es ausführlich in einem späteren Kapitel besprochen.

Der im *be11*-ORF kodierte foamyvirale Transaktivator Tas weist keinerlei Sequenzhomologien zu den Transaktivatoren anderer Retroviren auf (Rethwilm, 1995; Löchelt, 2003). Er wird von gespleißten, wie auch von ungespleißten, mRNAs translatiert wobei jedoch die gespleißte Variante überwiegt (Löchelt et al., 1994). Dieses 36kDa große Phosphoprotein verfügt über eine Transaktivierungsdomäne im C-terminalen Bereich, eine DNA-Bindungsdomäne, sowie über ein NLS (He et al., 1993; 1996; Venkatesh et al., 1993; Blair et al., 1994). Es aktiviert sowohl den U3 (Erlwein und Rethwilm, 1993; Lee et al., 1993), als auch den internen Promotor, letzteren mit höherer Affinität (Kang et al., 1998). Dabei bindet der Transaktivator sequenzspezifisch an die entsprechenden „Tas Response Elements“, die jeweils 5' der Promotoren liegen (Erlwein und Rethwilm, 1993; Löchelt et al., 2003).

Ein weiteres akzessorisches Protein der Foamyviren ist das Bet Protein. Es wird von einer zweifach gespleißten mRNA translatiert, die Sequenzen des *be11*-Gens mit denen des *be12*-Gens verbindet. Das daraus entstehende Protein teilt sich die ersten 88 AS mit dem Transaktivator Tas (Muranyi und Flügel, 1991). Die Funktion des Bet Proteins war lange Zeit ein Rätsel, da es zumindest für eine *in vitro* Replikation nicht notwendig ist (Rethwilm, 1996), obgleich es bei einer Infektion das Hauptimmunogen darstellt (Hahn et al., 1994). Auch lässt es sich nicht in aufgereinigten Viruspräparationen nachweisen (Löchelt et al., 2005). Erste Hinweise lieferten Bock und Kollegen (Bock et al., 1998), indem sie nachwiesen, dass Bet-exprimierende Zellen vor einer Superinfektion mit PFV geschützt sind. Eine weitere Funktion scheint eine Interaktion mit dem antiviralen Protein APOBEC3 zu sein (PFV: Russell et al., 2005; Delebeque et al., 2006; FFV: Löchelt et al., 2005). Dieses Protein ist eine zelluläre Cytidin-Deaminase, die durch die Deaminierung von Cytidinen zu Uracil im (-)-DNA-Strang während oder nach der reversen Transkription Hypermuationen in das virale Genom einführt. Die Inkorporation dieses antiviralen Proteins in die Viruspartikel wird durch eine spezifische Bindung über Bet verhindert (Löchelt et al., 2005; Russell et al., 2005).

1.2.3 Replikation der Foamyviren

Die Unterfamilie der Spumaretrovirinae unterscheidet sich hinsichtlich ihrer replikativen Strategien von der Unterfamilie der Orthoretrovirinae. Teilen sie sich mit allen Retroviren wesentliche Eigenschaften wie beispielsweise die obligate Integration in das Genom der infizierten Wirtszelle, so weisen sie Besonderheiten auf, die an die Replikation von

Hepdnaviren und an Retrotransposons erinnern (Abb.5) (Linial, 1999; Übersicht in Rethwilm, 2003).

Generell lässt sich sagen, dass Retroviren nur mitotisch aktive Zellen produktiv infizieren können. Eine Ausnahme bilden die Lentiviren die metabolisch aktive, aber sich nicht teilende Zellen infizieren und stabil ein Transgen exprimieren können (Ho et al., 1986; Bieniasz et al., 1995). Hierbei wird der Präintegrationskomplex aktiv mit Hilfe eines viralen Proteins durch die Kernporen geschleust. Die murinen Leukämieviren (MLV) hingegen, die über keine akzessorischen Proteine verfügen, sind von der Auflösung der Kernmembran während der Mitose abhängig, um ihr virales Genom in das der Wirtszelle zu integrieren (Lewis und Emermann, 1994). Für Foamyviren sind die Befunde nicht ganz eindeutig. Wird auf der einen Seite eine klare Zellzyklusabhängigkeit für die Replikation propagiert (Bieniasz et al., 1995; Trobridge und Russell, 2003), sprechen andere Studien davon, dass eine basale Replikation mit niedriger Effizienz auch in ruhenden Zellen möglich ist (Schliephake und Rethwilm, 1994; Saib et al., 1997; Imrich et al., 2000; Patton et al., 2004). Für eine starke Genexpression und hohe Replikationsrate jedoch benötigen auch Foamyviren mitotisch aktive Zellen.

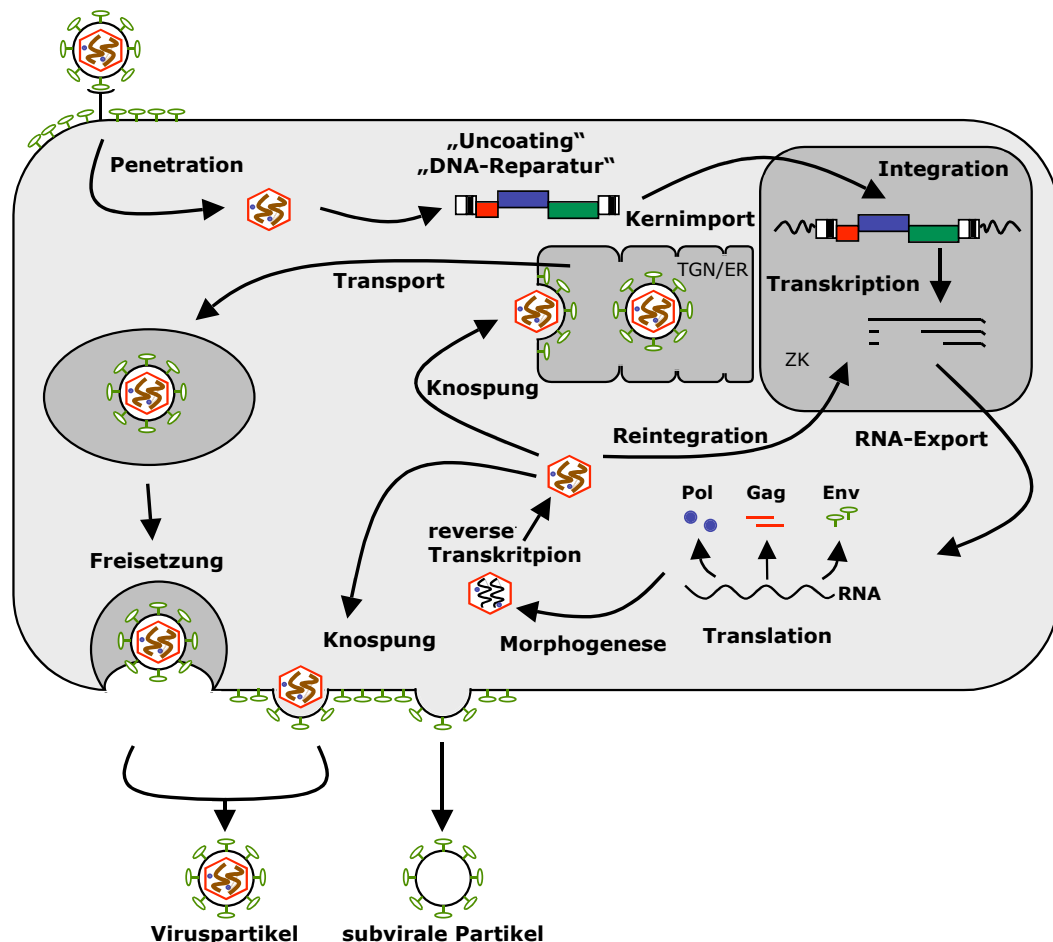


Abbildung 5: Der foamyvirale Replikationszyklus

Schematisch dargestellt sind die wichtigsten Ereignisse während der foamyviralen Replikation. Virale genomische DNA ist durch dicke braune Linien, virale RNA-Genome durch dünne schwarze Linien gekennzeichnet.

Die Tatsache, dass bislang noch keine Zelllinie und kein Gewebe identifiziert werden konnte, welches nicht von Foamyviren infizierbar gewesen wäre legt die Vermutung nahe,

dass es sich bei dem zellulären Rezeptor um ein ubiquitär vorkommendes Molekül handelt (McClure und Erlwein, 1995; Lindemann und Goepfert, 2003; Übersicht in Mergia und Heinkelein, 2003). Die Penetration der Wirtszelle erfolgt wahrscheinlich über einen pH-abhängigen Endozytoseweg (Picard-Maureau et al., 2003), wobei die Fusionsaktivität durch den niedrigen pH-Wert induziert wird. Nach dem Eintritt in die Zelle und dem Verlust der Hüllmembran gelangen die Kapside entlang dem Mikrotubuli-Netzwerk zum MTOC („microtubuli organizing center“) (Saib et al., 1997; Petit et al., 2003). In dieser kernnahen Region lassen sich kurz nach einer Infektion intakte Kapsidstrukturen am Zentrosom nachweisen (Lehmann-Che et al., 2007). Morphologisch intakte Kapside lassen sich über längere Zeit in dieser Region nachweisen (Lehmann-Che et al., 2007), dies ermöglicht Foamyviren eine Persistenz in ruhenden Zellen. In mitotisch aktiven Zellen zerfällt schließlich das Kapsid und gibt das virale Genom in Form von linearer ds-DNA frei (Moebes et al., 1997). Während bei allen anderen Retroviren die reverse Transkription ein frühes Ereignis während der Replikation ist (Modrow und Falke, 2003), also direkt nach dem Eintritt in die Zelle stattfindet, deuten experimentelle Befunde darauf hin, dass bei FV die retrograde Umschreibung des viralen RNA-Genoms bereits in der Produzentenzelle weitestgehend abgeschlossen ist (Moebes et al., 1997; Yu et al., 1996; 1998; 1999; Roy et al., 2003). In aufgereinigten PFV Viruspräparationen ist aber sowohl DNA als auch RNA nachweisbar, was auf eine gemischte Replikationsstrategie hindeutet, bei welcher der Schritt der reversen Transkription sowohl in der Produzentenzelle als auch in der neu infizierten Zelle stattfinden kann (Delelis et al., 2003). Eine Umschreibung des RNA-Genoms in ein intaktes DNA-Genom bereits in der Produzentenzelle eröffnet FV die Möglichkeit einer intrazellulären Reintegration statt einer Freisetzung aus der Zelle (Heinkelein et al., 2003). Ein solcher „replikativer Kurzschluß“ ist bereits für Hepadnaviren beschrieben worden (Nassal und Schaller, 1993; Ganem, 1996), die ebenfalls spät in ihrem Replikationszyklus revers transkribieren (Varmus und Brown, 1989; Nassal und Schaller, 1993).

Nach der Integration erfolgt die Expression und die Synthese der viralen Proteine. Bedingt durch ein im Gag befindliches CTRS findet die Morphogenese der foamyviralen Kapside in der Nähe der Zentriolen statt (Yu et al., 2006). Aufgrund eines ER-Retrieval-Signals (ERRS) im Env findet der Knospungsprozess wahrscheinlich hauptsächlich am ER statt (Übersicht in Lindemann und Goepfert, 2003), obgleich neuere Studien Hinweise dafür liefern, dass FV Partikel wie alle anderen Retroviren doch überwiegend über die Plasmamembran knospen (Lindemann, persönliche Mitteilung). Die in das ER abgeschnürten Partikel werden dann möglicherweise über einen exozytotischen Exportweg freigesetzt.

1.3 Das Foamyvirus Env Glykoprotein

Die Zellmembran stellt die erste zu überwindende Barriere im Replikationszyklus eines Virus dar. Die auf ihr enthaltenen Rezeptoren und Oberflächenmoleküle bedingen den viralen Zelltropismus. Wenn der spezifische Rezeptor auf der Zielzelle durch das virale Env Protein gebunden wird, kommt es durch konformationelle Änderungen in der räumlichen Struktur des Hüllproteins zur Verschmelzung der viralen Hüllmembran mit der Zellmembran. Diese Membranverschmelzung ist ein essentieller Schritt und kann direkt auf der Zelloberfläche, oder nach Endozytose in vesikulären Strukturen stattfinden (Picard-Maureau

et al., 2003). Dies bewirkt schließlich, dass das Viruskapsid und somit das virale Genom in die neu infizierte Zelle freigelassen wird (Dimitrov, 2004).

Die meisten retroviralen Hüllproteine werden während oder direkt nach der Translation am rER durch zelluläre Proteasen in ihre funktionellen Untereinheiten SP, SU und TM gespalten, und während des Transports an die Zelloberfläche postranslational, beispielsweise durch Glykosidasen oder Ubiquitin-Ligasen, modifiziert.

1.3.1 Formen des PFV Hüllproteins Env

In Lysaten transient transfizierter oder infizierter Zellen kann man zwei unterschiedliche Varianten des foamyviralen Vorläuferproteins nachweisen. Eine Glykoproteinvariante mit 170kDa Größe und eine mit 130kDa, die in einem Verhältnis von 1:3 vorliegen (Netzer et al., 1990; Giron et al., 1993; 1998; Lindemann und Rethwilm, 1998). Analysen ergaben, dass es sich bei der 170kDa Variante um ein Fusionsprodukt aus den extrazellulären Domänen des Env Proteins und denen des Bet Proteins handelt (Lindemann und Rethwilm, 1998; Giron et al., 1998). Ein ähnliches Fusionsprotein ist auch für HIV-1 beschrieben worden, bei welchem Domänen des Transaktivators Tat mit Domänen des Hüllproteins Env und des posttranskriptionell wirkenden Transaktivators Rev fusioniert sind (Benko et al., 1990).

Das gp170^{Env-Bet} Fusionsprotein wird von einer mehrfach gespleißten mRNA translatiert, deren Transkription vom U3 Promotor reguliert wird (Lindemann und Rethwilm, 1998). Da es sich um die extrazellulären Domänen des Env Proteins handelt, sind im C-terminalen Bereich sowohl die membranspannende (MSD) als auch die zytoplasmatische (CyD) Domäne durch den alternativen Spleißvorgang deletiert. Hierzu wird ein in allen FV Spezies konserviertes SD/SA Paar genutzt, das für die IP-getriebene Transkription der Tas und Bet mRNAs benötigt wird (Löchelt et al., 1994). Durch die fehlende MSD liegt das Protein in keiner Membran verankert vor und wird in großen Mengen von Produzentenzellen sezerniert, jedoch nicht von anderen Zellen aufgenommen (Giron et al., 1998). Die biologische Funktion dieses Env-Bet Proteins ist bislang nicht geklärt, da es für eine *in vitro*-Replikation entbehrlich ist. Auch ist es in aufgereinigten Viruspräparationen nicht nachweisbar, was darauf hindeutet, dass es nicht partikelassoziiert vorliegt (Lindemann und Rethwilm, 1998).

Das gp130^{Env} hingegen liegt partikelassoziiert vor und unterscheidet sich von anderen retroviralen Hüllproteinen in vielerlei Hinsicht. So ist es beispielsweise absolut notwendig für den Knospungsvorgang und das Abschnüren von Viruspartikeln (Baldwin et al., 1998; Fischer et al., 1998), es trägt ein „ER-Retrieval Signal“ für eine Retention im ER (Goepfert et al., 1995; 1997; 1999) und das Signal- oder Leaderpeptid (LP) wird nicht von einem Signalpeptidase Komplex, sondern von Furin oder einer Furin-ähnlichen Protease prozessiert (Duda et al., 2004; Geiselhart et al., 2004).

1.3.2 Eigenschaften und Domänen des FV Hüllproteins

Das FV Env Protein liegt als trimere Komplex auf der Oberfläche transfizierter oder infizierter Zellen vor. Hierbei ordnen sich diese trimere Heterodimere aus den SU und TM Untereinheiten zu sechsfachen Einheiten zusammen, was diesem Komplex eine zusätzliche Stabilität verleiht (Wilk et al., 2000). Die Determinanten für den Aufbau dieser Hüllproteinkomplexe liegen in der TM Untereinheit, da die SU Untereinheit nur zur Bildung

von Monomere in der Lage ist (Hunter, 1997; Swanstrom und Wills, 1997). Die Eigenschaft der Oberflächenexpression vermittelt bei Foamyviren, genauso wie auch bei anderen Retroviren (z.B. HIV und MuLV), eine Superinfektionsresistenz (SIR) (Berg et al., 2003). Hierbei wird durch eine Interaktion des Hüllproteins mit seinem spezifischen Rezeptor dieser von der Oberfläche herunterreguliert. Diese Interaktion kann direkt auf der Zelloberfläche oder auch intrazellulär stattfinden (Stevenson et al., 1988; Delwart und Panganiban, 1989; Sommerfelt und Weiss, 1990; Heard und Damos, 1991). Durch *in vitro* Versuche konnte die Fähigkeit des FV Env eine SIR zu vermitteln nachgewiesen werden (Berg et al., 2003). Hierbei konnten stabil PFV Env-exprimierende Zellen von Foamyviren nicht infiziert werden, jedoch von anderen Retroviren, was auf eine direkte Interaktion des FV Env mit dem spezifischen Rezeptor hinweist. Eine korrekte Prozessierung, sowie ein ungestörter Transport des Hüllproteins an die Zelloberfläche ist jedoch unabdingbar für die Etablierung einer Superinfektionsresistenz (Berg et al., 2003). In neueren *in vivo* Studien wurden jedoch Superinfektionen in der Katze mit felinem FV nachgewiesen (Phung et al., 2005). Das könnte eine Folge niedriger *in vivo* Replikationsraten von Foamyviren sein da möglicherweise so nur relativ wenig Env an die Oberfläche gelangt und keinen ausreichenden Schutz gegen eine Überinfektion vermitteln kann.

Die Abspaltung des Signalpeptides erfolgt bei Retroviren meist spät nach der Translation durch eine Signalpeptidase. Die von Wang und Mulligan (1999) vorhergesagten möglichen Schnittstellen für eine Spaltung durch den Signalpeptidase Komplex an den Aminosäurepositionen C₈₆ und/oder G₁₄₈ im FV Env Protein konnten experimentell nicht bestätigt werden. Mutationen in diesen Bereichen führten zu keinen oder nur geringen Beeinträchtigungen der Prozessierungseffizienz. Duda und Kollegen (Duda et al., 2004) gelang es schließlich durch Ansequenzieren der prozessierten Proteine die tatsächlichen Schnittstellen zu identifizieren. Bei der LP/SU Schnittstelle (R₁₂₆) handelt es sich um eine minimale, bei der SU/TM Schnittstelle (R₅₇₁) um eine optimale Konsensus-Sequenz für Furin oder eine Furin-ähnliche Protease (Duda et al., 2004). Die Spaltung des Vorläuferproteins in die funktionellen Untereinheiten LP (gp18^{LP}), SU (gp80^{SU}) und TM (gp48TM) geschieht also posttranslational durch zelluläre Proteasen, wobei eine Prozessierung zwischen LP und SU nicht, zwischen SU und TM aber unabdingbar für die Freisetzung infektiöser Viruspartikel ist (Bansal et al., 2000; Pietschmann et al., 2000; Duda et al., 2004). Diese Spaltung des Vorläufers in die funktionellen Untereinheiten erfolgt bei Foamyviren wahrscheinlich simultan, da man keine Prozessierungsintermediate nachweisen kann (Lindemann et al., 2001). Während das Vorläuferprotein gp130^{Env} eine Typ III-Topologie besitzt (Geiselhart et al., 2003), d.h. dass sich sowohl der N- als auch der C-Terminus im Zytoplasma befindet, hat das LP nach der Prozessierung eine Typ II-Konformation mit dem N-Terminus im Zytoplasma und die TM Untereinheit eine, durch den im Zellinneren befindlichen C-Terminus, als Typ I-Membrantopologie definierte Konformation (Duda et al., 2006).

Generell ergeben sich aus der Dreiteilung retroviraler Hüllglykoproteine funktionelle Untereinheiten, die ihrerseits voneinander unterscheidbare, für die Biologie des Proteins entscheidende, Domänen beherbergen (Abb.6) (Übersicht in Lindemann und Goepfert, 2003).

1.3.2.1 Das FV Leaderpeptid (gp18^{LP})

Signalpeptide besitzen in der Regel eine dreiteilige Domänenorganisation. Am N-Terminus befindet sich eine aus polaren Aminosäuren bestehende Domäne (n-Domäne), auf welche eine 6-15 AS messende hydrophobe Domäne (h-Domäne) folgt. C-terminal liegt eine weitere polare Region mit Helixbrechern und kleinen ungeladenen AS (c-Domäne), welche die Erkennungssequenzen für den Signalpeptidase Komplex darstellen (Martoglio und Dobberstein, 1998). Das für Retroviren mit 126 AS ungewöhnlich lange Signalpeptid des PFV Env (LP) weist eine eben solche Organisation auf (Lindemann und Goepfert, 2003). Anders als bei Orthoretroviren spielt es eine entscheidende Rolle bei der Freisetzung von Viruspartikeln und ist nicht nur im Lysat infizierter und transfizierter Zellen, sondern auch in aufgereinigten Viruspräparationen zu finden (Lindemann et al., 2001).

Eine für Foamyviren typische Eigenschaft ist die für eine Partikelfreisetzung nötige Koexpression von Gag und Env. Im Gegensatz zu Orthoretroviren (Shioda und Shibuta, 1990) sind foamyvirale Kapside ohne die Anwesenheit des Glykoproteins nicht dazu in der Lage sich über zelluläre Membranen abzuschneiden und liegen aggregiert im Zytoplasma vor (Baldwin und Linial, 1998; Fischer et al., 1998; Pietschmann et al., 1999). Für eine effiziente FV Partikelfreisetzung ist eine spezifische Interaktion zwischen dem LP und dem Gag Protein notwendig (Lindemann et al., 2001; Wilk et al., 2001). Diese Interaktion wird durch die so genannte „Budding-Domäne“ am N-Terminus des FV LP (n-Domäne) vermittelt. Obgleich diese funktionelle Domäne nicht an den eigentlichen Funktionen des Hüllproteins wie beispielsweise der Rezeptorbindung beteiligt ist, führt eine Deletion der ersten 15 AS des LP zum Verlust der Freisetzung von Viruspartikeln bei gleichzeitig verstärkter Oberflächenexpression des Proteins (Lindemann et al., 2001). Wesentlich für diese Interaktion sind zwei evolutionär konservierte Tryptophane an den Aminosäurepositionen 10 und 13 (W_{10,13}) (Lindemann et al., 2001; Wilk et al., 2001). Experimentelle Befunde unterstützen die Notwendigkeit dieser Tryptophane bei der Interaktion mit Gag (Lindemann et al., 2001), wohingegen das für die Morphogenese der Kapside wichtige Arginin (R₅₀) im PFV Gag daran nicht beteiligt zu sein scheint (Geiselhart et al., 2003). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es nicht möglich ist diese Domäne funktionell durch entsprechende Domänen heterologer Hüllproteine zu ersetzen (Pietschmann et al., 1999), was die Spezifität dieser Wechselwirkung noch verdeutlicht.

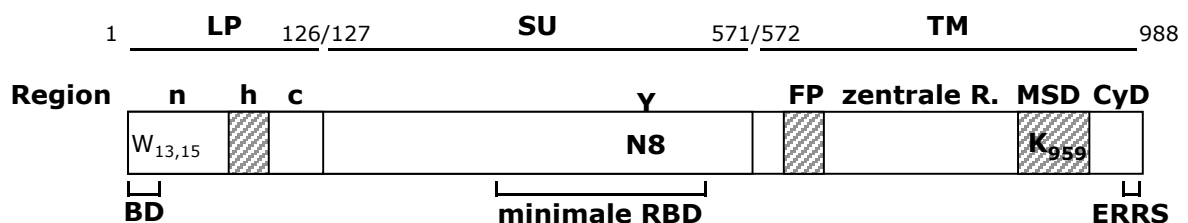


Abbildung 6: Übersicht über funktionelle Domänen des PFV Env

Schematische Darstellung der Domänenorganisation des Foamy Virus Hüllproteins. Dargestellt sind die Untereinheiten und die wichtigsten funktionellen Abschnitte. LP: Leaderpeptid; SU: Oberflächenuntereinheit; TM: Transmembranuntereinheit; n: N-terminale polare Domäne; h: hydrophobe Domäne; c: C-terminale polare Domäne; Y: essentielle N-Glykosylierungsstelle; FP: Fusionspeptid; MSD: membranspannende Domäne; CyD: zytoplasmatische Domäne; W: Tryptophan; K: Lysin; BD: Budding Domäne; RBD: Rezeptorbindungsdomäne; ERRS: ER Retrieval Signal.

Diese Befunde verdeutlichen die funktionelle Einzigartigkeit des foamyviralen Signalpeptids, da es über die Funktion eines üblichen Signalpeptids hinaus essentielle Funktionen bei der Virusmorphogenese, Freisetzung und Infektiosität spielt. Um die Bedeutung dieses Proteins zu unterstreichen, wird es in der Literatur als Leaderpeptid und nicht als Signalpeptid bezeichnet.

1.3.2.2 Die Oberflächenuntereinheit (gp80^{SU})

Die 445 AS umspannende, für die Rezeptorbindung notwendige Oberflächenuntereinheit liegt mit den extrazellulären Domänen der TM Untereinheit in einem Komplex verbunden vor (Lindemann et al., 2001; Wilk et al., 2001). Sie stellt *in vivo* das immunogene Hauptepitop, wobei dieses nicht aus einer linearen Aminosäuresequenz besteht, was auf eine globuläre Struktur dieser Domäne hinweist (Herchenröder et al., 1998; Zemba et al., 2000).

Wie bei Orthoretroviren ist diese Domäne verantwortlich für die Bindung des spezifischen Rezeptors auf der Oberfläche der Zielzellen (Herchenröder et al., 1999; Duda et al., 2006). Die minimale Rezeptorbindungsdomäne (RBD) hat eine Länge von 331 Aminosäuren (Abb.6) und erstreckt sich von den Aminosäurepositionen 225 bis 555 (Duda et al., 2006). Durch Deletionsanalysen konnte nachgewiesen werden, dass sowohl der N- als auch der C-Terminus dieser RBD für die Rezeptorbindung essentiell, hingegen Bereiche in der Mitte dieser Domäne entbehrlich sind. Eine N-Glykosylierung (N8) ebenso wie einzelne Cysteine sind für die Funktion dieses Proteins unabdingbar, da sie wahrscheinlich die Determinanten für eine korrekte globuläre Struktur darstellen (Duda et al., 2006). Die Bindungsstärke des PFV Hüllproteins an seinen Rezeptor liegt experimentell unter der des HIV gp120^{SU} an das entsprechende Membranprotein (Herchenröder et al., 1998). Darüber hinaus ergab eine Analyse der Bindungskinetik die Wahrscheinlichkeit zweier Rezeptoren auf der Oberfläche von Zielzellen, wobei einer mit höherer und einer mit niedriger Affinität gebunden wird (Herchenröder et al., 1998). Bislang ist der Rezeptor für Foamyviren jedoch nicht bekannt. Möglicherweise handelt es sich hierbei auch nicht um ein Membranprotein, da es nicht Trypsin-sensitiv ist, sondern vielmehr um eine ubiquitär vorkommende Struktur wie beispielsweise ein Glykolipid (Herchenröder et al., 1998).

Im Gegensatz zum PFV LP zeigt die foamyvirale SU Untereinheit alle für Retroviren typischen Eigenschaften. Sie liegt in einem Komplex mit der TM Untereinheit vor, besitzt eine globuläre Konformation und vermittelt die Rezeptorbindung. Außerdem ist sie auf Grund ihrer exponierten Position auf der Außenseite der Viruspartikel das Hauptimmunogen von PFV.

1.3.2.3 Die Transmembranuntereinheit (gp48TM)

Foamyviren knospen wahrscheinlich in erster Linie intrazellulär über Membranen des Endoplasmatischen Reticulums oder des Golgi Apparates, bzw. des Trans-Golgi Netzwerkes und nur in geringem Maße über die Plasmamembran (Baldwin et al., 1998; Fischer et al., 1998; Zemba et al., 1998; Yu et al., 2006). Neue bislang unveröffentlichte Befunde legen jedoch die Vermutung einer nicht so geringen Bedeutung der Plasmamembran beim Vorgang des Abschnürens von der Produzentenzelle nahe (Lindemann, persönliche Mitteilung). Im LP konnte durch Deletionen am N-Terminus eine Region identifiziert werden,

die einen Einfluß auf die intrazelluläre Verteilung des Hüllproteins hat. Ein Verlust der „Budding-Domäne“ führt zu einer massiven Oberflächenexpression des Hüllproteins (Lindemann et al., 2001).

Eine Lokalisation im ER ist meist jedoch die Folge eines ER-Rückholsignals („ER Retrieval-Signal“, ERRS). Bislang wurden zwei allgemeine Sequenzen beschrieben, die als ein solches Signal wirken. Ein im Lumen befindliches Tetrapeptid (KDEL) bewirkt einen verstärkten Rücktransport vom Golgi-Apparat zum ER (Munro und Pelham, 1987), wohingegen ein zytoplasmatisches Dilysin-Motiv einen retrograden vesikulären Transport von post-ER Kompartimenten zurück ins ER induziert (Jackson et al., 1990; 1993). Dieser Transport erfolgt über „Cytosolic Coat Proteins“ (COPs) und das Dilysin-Motiv sollte an den Positionen –3 bis –5 am C-Terminus des entsprechenden Proteins zu finden sein (Cosson und Letourneur, 1994). Die bei FV am C-Terminus, in der zytoplasmatischen Domäne (CyD) der TM Untereinheit, liegenden Lysine werden als funktionelles ERRS beschrieben, wodurch die vornehmliche Knospung in das ER erklärt wird (Abb.6) (Goepfert et al., 1995; 1997; 1999). Eine Inaktivierung dieses Signals führt zu einer verstärkten Knospung foamyviraler Partikel über die Plasmamembran (Goepfert et al., 1999). Durch Mutationen dieses Signals wird zwar die Replikationskinetik negativ beeinflusst, nicht jedoch die absolute Menge und Infektiosität freigesetzter Viruspartikel. Auch scheint *in vitro* kein selektiver Vorteil in einem solchen Signal zu liegen, da selbst bei Langzeitpassagen keine Rückmutation zu beobachten war (Goepfert et al., 1999). Gängige Theorien besagen, dass dieses Signal durch verringerte Oberflächenexpression der Env Proteine der Vermeidung von Synzytiabildung dient und dadurch den durch die Bildung von Riesenzellen ausgelösten Zelltod verzögert. Darüber hinaus könnte es auch durch die intrazellulär stattfindende Morphogenese Foamy Viren dazu befähigen, länger dem Immunsystem des Wirtes zu entgehen. Bei equinen Foamyvirus Isolaten, die vorwiegend über die Plasmamembran knospen, konnte kein solches Dilysin-Motiv gefunden werden (Tobaly-Tapiero et al., 2000).

Strangaufwärts schließt sich an die CyD der TM Untereinheit die membranspannende Domäne (MSD) an (Wang und Mulligan, 1999). Sie ist zusammen mit dem Fusionspeptid (FP) essentiell für die Fusion der Virus- mit der Wirtszellmembran. Funktionell lässt sich diese Domäne wiederum in einen N- und einen C-terminalen Bereich aufteilen. Während die komplette MSD für eine Membranfusion benötigt wird, ist der C-terminale Bereich für die Verankerung des Proteins in der Membran entbehrlich (Pietschmann et al., 2000). In der Mitte der MSD befindet sich ein für die Retention im ER und für die Fusionsaktivität wichtiges konserviertes Lysin (K₉₅₉). Ein nicht konservativer Austausch des Lysins in Leuzin bewirkt durch die Änderung der Ladung eine 20-40fache Steigerung der Fusionsaktivität und einen massiven Anstieg der Oberflächenexpression. Hierbei ist weniger die exakte Aminosäure, sondern viel mehr die Ladung entscheidend (Pietschmann et al., 2000). Im Gegensatz zur CyD, die für eine Partikelfreisetzung entbehrlich ist, ist eine intakte MSD für die Sekretion von FV Partikeln notwendig und kann nicht funktionell durch membranspannende Domänen anderer Retroviren ersetzt werden, ebenso wenig wie durch andere Membrananker wie beispielsweise Glykophospholipide (Pietschmann et al., 1999).

Zwischen dem FP und der MSD befindet sich in der TM Untereinheit von FV, wie für Retroviren typisch, eine zentrale Region aus β -Faltblättern. Diese wird von zwei α -Helices flankiert, die direkt strangabwärts des FP und strangaufwärts der MSD liegen (Wang und

Mulligan, 1999). Diese zentrale Region ist für Retroviren ungewöhnlich lang, worauf auch die in elektronenmikroskopischen Aufnahmen charakteristischen „Env-Spikes“ zurück zu führen sind (Wang und Mulligan, 1999; Eband und Eband, 2001).

Das am N-Terminus der Transmembranuntereinheit gelegene Fusionspeptid besteht aus einer amphipatischen α -Helix (Wang und Mulligan, 1999) und vermittelt im Verbund mit der MSD die Verschmelzung der Membranen während einer Infektion.

Die TM Untereinheit erfüllt also viele der biologisch wichtigen Funktionen wie der Membranfusion, der Verankerung des Proteins in der Membran und der Retention des Proteins im Zellinneren am Ort der Morphogenese. Darüber hinaus enthält es noch eine nicht näher identifizierte Interaktionsdomäne für die Bildung der trimere Env Komplexe auf der Oberfläche der Zellmembranen.

Neben klar abgetrennten, singulären Domänen existieren im PFV Env Glykoprotein auch funktionelle Domänen, die nur im Konzert miteinander ihre volle Wirkung entfalten können. So existieren drei voneinander unabhängige ER Rückhaltemechanismen, zwei in der TM und eine im LP, die aber einzeln nicht ausreichen, um die wildtypische Verteilung des Proteins in der Zelle zu garantieren. Darüber hinaus ist der spezifische Knospungsprozess von Foamyviren zum einen abhängig von der „Budding-Domäne“ im LP, zum anderen von der Unversehrtheit der MSD in der TM. Diese Eigenschaften spiegeln die biologische Komplexität eines solchen Proteins wider. Zwar können einzelne Domänen charakterisiert und kartiert werden, ihre Ladung bestimmt und ihre Hydrophilität ermittelt werden, aber die globale Funktion ist meist nur im Kontext des gesamten Proteins oder im Zusammenspiel mit anderen viralen Komponenten erkennbar.

1.4 Posttranslationale Modifikationen von Membranproteinen

Bereits während der Translation und der Translokation von Sekret- und Membranproteinen in das ER werden diese kovalent modifiziert. Diese Modifikationen wie beispielsweise Glykosylierungen, Ubiquitinierungen, das Knüpfen von Disulfidbrücken oder proteolytische Spaltungen erfolgen während des sekretorischen Transports an die Oberfläche der Zelle. Dabei sind sie keinesfalls unabänderlich und starr, sondern werden viel mehr in einer Reihe von aufeinander folgenden Reaktionen in verschiedenen Zellorganellen hinzugefügt, wieder entfernt und verändert.

1.4.1 N-Glykosylierung

Viele Sekret- und Membranproteine tragen angehängte Kohlenhydratgruppen, durch die sie während ihrer Reifung kovalent modifiziert wurden. Neben O-Glykosylierungen, die an Serin oder Threonin gebunden vorliegen und meist mit nur vier Monosacchariden recht klein sind, bestehen die biologisch bedeutsameren N-Glykosylierungen aus einer komplexen Anordnung von mindestens fünf Monosacchariden in welcher immer Mannose und N-Acetylglucosamin zu finden sind.

Die allgemeine Erkennungssequenz für N-Glykosylierungen ist die Aminosäuresequenz Asn-X-Ser/Thr, wobei X jede beliebige Aminosäure außer Prolin sein kann (Kornfeld und Kornfeld, 1985; Gavel und von Heijne, 1990). Die Kohlenhydratgruppe wird dann an das Stickstoffatom des Asparagins angehängt.

Der Prozess der N-Glykosylierung beginnt kotranslational während der Synthese des Proteins sobald das zu modifizierende Asparagin 12-14 AS von der Membran des ER entfernt ist (Nilsson und von Heijne, 1993). Im Gegensatz zu O-Glykosylierungen, bei welchen alle Monosaccharide einzeln angehängt werden, geschieht dies bei N-Glykosylierungen en bloc durch die Oligosaccharidtransferase (Lodish, 1996). Dabei dient Dolichol als „Carrier-Molekül“, an welches die vorgefertigten Kohlenhydratketten gebunden vorliegen. Unmittelbar nach der Übertragung des Glykans werden die 3 endständigen Glukosereste, sowie ein bestimmter Mannoserest abgespalten. An diesem Punkt beginnt schließlich die individuelle Prozessierung der Zuckergruppen. Bei der Prozessierung der Kohlenhydratketten dient stets das Produkt der einen Reaktion als Substrat der nächsten, wobei die Art der Glykosylierung abhängig vom jeweiligen Zell- bzw. Gewebetyp ist. Prinzipiell jedoch existieren drei Grundvariationen, die man als den „High-Mannose Typ“, den „hybriden Typ“ sowie den „komplexen Typ“ beschreibt (Abb.7) (Stryer, 1996).

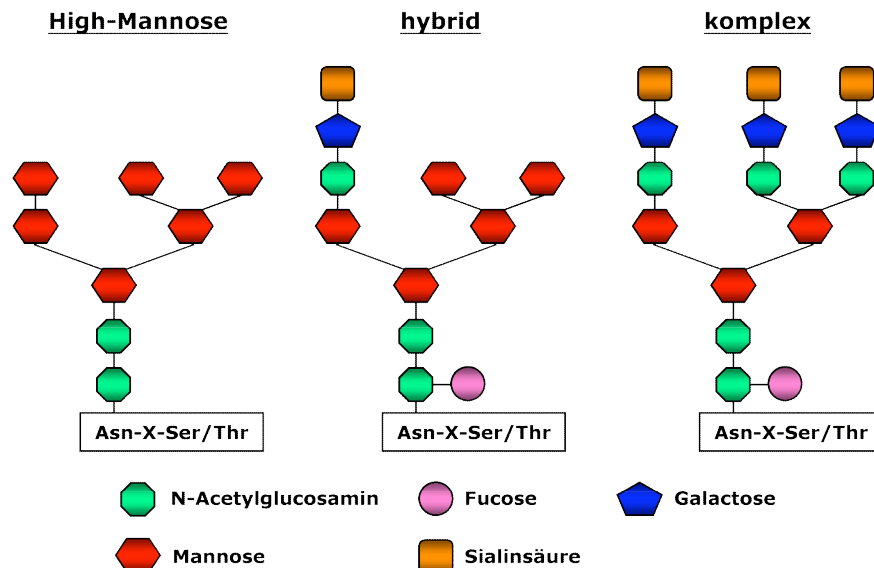


Abbildung 7: Schematische Darstellung der drei Grundtypen N-glykosidisch gebundener Kohlenwasserstoffe

Zuckergruppen des High-Mannose Typs bestehen ausschließlich aus N-Acetylglucosamin und Mannose. Hybride Oligosaccharide hingegen bestehen teilweise aus komplexen Verzweigungen, teilweise aus Mannose-reichen Bereichen, wobei komplexe Zucker eine unterschiedliche Anzahl an Verzweigungen aufweisen können, mit variierender Anzahl an N-Acetylglucosaminresten. Darüber hinaus kann auch die Art der glykosidischen Bindung zwischen den N-Acetylglucosaminresten und der Galactose sich unterscheiden (Abb.7).

Die Prozessierung der Kohlenhydratgruppen findet in unterschiedlichen Kompartimenten des sekretorischen Exportweges statt, wodurch sich die Lokalisation eines Glykoproteins anhand seiner spezifischen Sensitivität gegenüber bestimmten Glykosidasen feststellen lässt. Ist ein Protein gegenüber der Glykosidase Endo H vollständig sensitiv, trägt es ausschließlich Zucker des High-Mannose Typs und befindet sich im ER und im cis-Golgi Bereich. Ist es aber bereits partiell Endo H resistent trägt es Zuckergruppen des hybriden und/oder des komplexen Typs und befindet sich im medialen und trans-Golgi Bereich,

wohingegen eine Sensitivität gegen Sialidase auf eine Lokalisation im trans-Golgi-Apparat hinweist (Kornfeld und Kornfeld, 1985; Tarentino et al., 1989).

Glykosylierungen haben mannigfaltige Auswirkungen auf das Schicksal und die Funktion von Proteinen. So dient die N-Glykosylierung als Qualitätskontrolle während der Reifung und der proteolytischen Prozessierung eines Proteins (Hurtley und Helenius, 1989; Brewer und Corley, 1996; Nauseef, 1999). Weniger als die Hälfte der in das ER synthetisierten Polypeptide schafft es, sich in die korrekte Form zu falten (Hurtley und Helenius, 1989). Der komplexe Vorgang der Proteinfaltung wird durch Enzyme, so genannte Chaperone, unterstützt. Solange ein Protein an ein solches Chaperon gebunden vorliegt, gilt es als inkomplett gefaltet und verbleibt gebunden im ER. Diese die Faltung unterstützenden Proteine dienen als Sensoren und „erkennen“ die globuläre Struktur des gebundenen Proteins. Hierbei spielen N-glykosidisch gebundene Oligosaccharide eine entscheidende Rolle (Chen et al., 1995; Chen und Helenius, 2000; Molinari und Helenius, 2000). Unreife Membranproteine werden anhand ihrer endständigen Glucosereste spezifisch von Calnexin und Calreticulin erkannt und gebunden (Sousa und Parodi, 1995; Helenius et al., 1997; Gething, 1997; Zapun et al., 1999). Darauf folgen mehrere Zyklen von Glukoseadditionen und –abspaltungen im ER, damit sichergestellt wird, dass ein Glykoprotein richtig gefaltet und somit bereit für den Export in den Golgi-Apparat ist. Dieser Glukose-bedingte Faltungs- und Entfaltungszyklus ist neben den Chaperonen Calnexin und Calreticulin noch abhängig von der Glukosidase II, die Glukosereste entfernt, und von einer Uridindiphosphat (UDP)-Glukose:Glykoprotein Glykosyltransferase, die ihrerseits Glukose an das entstehende Protein addiert (Parodi et al., 1983; Trombetta und Parodi, 1992). Nach vollständiger Faltung endet die Glykosylierung im ER, endständige Glukosereste werden abgespalten, das Protein wird aus der Bindung mit Calnexin entlassen und kann aus diesem Kompartiment exportiert werden.

Fehlgefaltete Proteine jedoch bleiben am Calnexin gebunden im ER zurück und bilden Aggregate. Diese durchlaufen Zyklen von Rearrangements, oder werden schließlich in das Zytosol exportiert und durch das 26S Proteasom degradiert (Kopito et al., 1997).

Darüber hinaus haben N-Glykosylierungen Einfluß auf die Stabilität und Konformation von Proteinen (Fenouillet et al., 1994; Ratner, 1992; Li et al., 1993), auf den intrazellulären Transport (Dash et al., 1994; Fenouillet et al., 1995) und die proteolytische Spaltung (Schultz und Oroszlan, 1979; Rein et al., 1982).

Eine N-Glykosylierung und Interaktion mit zellulären Chaperonen wie Calnexin (Yamashita et al., 1996) ist für viele virale Hüllglykoproteine bereits nachgewiesen worden (HSV: Sodora et al., 1989; Sendai Virus: Vidal et al., 1989; Influenza: Gallagher et al., 1992; HIV: Li et al., 1993; HBV: Lu et al., 1995; Ebola: Feldmann et al., 1994; VSV: Gallione et al., 1983; Dengue Virus: Wengler und Wengler, 1989; Masern: Richardson et al., 1986; HCV: Grakoui et al., 1993; MuLV: Polonoff et al., 1982). Auch hier hat die Modifikation mit Kohlenhydratketten Einfluß auf den intrazellulären Transport der Proteine, deren Faltung und Prozessierung, sowie ihre biologische Funktion im Hinblick auf die Rezeptorerkennung und –bindung.

Bei HIV konnte gezeigt werden, dass an alle 24 potentiellen N-Glykosylierungsstellen (NGS) Zuckergruppen angehängt werden (Leonard et al., 1990) und diese sich auf der Oberfläche des Proteins in zwei voneinander getrennten Clustern anordnen (Zhu et al.,

2000). Das Molekulargewicht der HIV gp120^{SU}-Untereinheit wird zu 50% durch N-Glykosylierungen bedingt (Zhu et al., 2000). Diese auf der Oberfläche befindlichen Zucker fungieren als Schild gegen das Immunsystem des Wirtes (Bolmstedt et al., 1993; Wyatt et al., 1993; Back et al., 1994, Dacheux et al., 2004), welches das Virus vor einer Neutralisierung durch spezifische Antikörper bewahrt. Bedingt durch die globuläre Struktur wird aber auch die Effizienz der Korezeptorbindung beeinträchtigt, wie durch Mutationsanalysen gezeigt werden konnte (Polzer et al., 2001). Der Aminosäureaustausch von Asparagin zu beispielsweise Glutamin in den V1-V4 Loops der SU Domäne hat einen kumulativen Effekt zur Folge, bei welchem die Inaktivierung von drei NGS zu keinem, der Austausch von vier bis fünf NGS zu einem mäßigen und die Inaktivierung von allen NGS zu einem totalen Verlust der Fusionsaktivität führt (Quiñones-Kochs et al., 2002). Doch auch ein einzelner Austausch von Asparagin kann zu Phänotypen in Hinblick auf andere biologische Funktionen des Proteins führen, wie beispielsweise ein Korezeptorwechsel von CCR5 auf CXCR4 (Pollakis et al., 2001) oder eine veränderte Sensibilität gegenüber neutralisierenden Antikörpern (Gram et al., 1994; Back et al., 1994).

Bei einer anderen Gruppe von Retroviren, den Maus Leukämie Viren (MuLV), sind im Gegensatz zu HIV alle 7-8 NGS evolutionär konserviert und werden auch glykosyliert (Perez et al., 1981; Polonoff et al., 1982; Pinter et al., 1989). Der Verlust einer spezifischen NGS führt zu einem totalen Verlust der Prozessierung dieses Proteins und dessen Export aus dem ER (Kayman et al., 1991). *In vitro* scheinen die restlichen NGS für eine Replikation und Infektion entbehrlich zu sein, aber es fehlen entsprechende *in vivo* Studien um eine mögliche immunmodulatorische Funktion ausschließen zu können.

Neben den Retroviren gibt es auch andere Virusfamilien mit glykosylierten Hüllproteinen, wie beispielsweise den Hepadnaviren, bei welchen eine N-Glykosylierung für die Sekretion viraler Partikel notwendig ist. Unterbindet man durch Zugabe von Tunicamycin eine Glykosylierung im ER, resultiert dies in einer Freisetzung von subviralen, nicht aber von viralen Partikeln. Die Glykosylierung scheint notwendig für die spezifische Interaktion des Hüllproteins mit den viralen Nukleokapsiden zu sein (Lu et al., 1995). Auch konnte nachgewiesen werden, dass nicht nur eine Glykosylierung an sich notwendig ist, sondern die angehängten Oligosaccharide müssen in spezifischer Weise prozessiert werden (Block et al., 1994).

N-Glykosylierungen nehmen also starken Einfluß auf das Schicksal eines Membran- oder Sekretproteins, beginnend bei der kotranslationalen Faltung des Proteins in die korrekte räumliche Struktur, über den Export aus dem ER und den Transport an die Oberfläche. Auch kann die Prozessierung eines Proteins durch fehlende oder fehlerhafte N-Glykosylierungen stark herabgesetzt oder inhibiert werden, was nicht zuletzt auf eine fehlerhafte Faltung zurückgehen kann. Schließlich können diese globulären Strukturen auf der Oberfläche von Proteinen immunogene Epitope maskieren und so immunmodulatorisch wirken.

1.4.2 Ubiquitinierung

Ubiquitin ist ein unter Eukaryoten hoch konserviertes Protein und variiert in seiner Aminosäuresequenz um lediglich drei Aminosäuren von der Hefe zum Menschen (Weissman, 2001; Fang und Weissman, 2004). Die post-translationale Modifikation von

Proteinen durch kovalente Verknüpfung mit Ubiquitin spielt eine fundamentale Rolle im Schicksal dieser Proteine. Die klassische und bereits seit langem bekannte Funktion einer Ubiquitinierung ist das Markieren von Substratproteinen für einen proteasomalen Abbau (Johnson et al., 1992; 1995; Thrower et al., 2000; Weissman, 2001), wobei als Signal für den Abbau durch das Proteasom Polyubiquitinketten von mindestens vier Ubiquitinmolekülen benötigt werden (Weissman, 2001). Darüber hinaus kann aber eine Ubiquitinierung durch eine Chaperon-ähnliche Funktion auch die Faltung eines Proteins unterstützen und somit einer Degradierung entgegen wirken (Finley et al., 1989). Die Markierung eines Proteins mit Ubiquitin erfolgt in den meisten Fällen über die im Substrat enthaltenden Lysine wobei eine Isopeptidbindung zwischen dem C-terminalen Glyzin des Ubiquitins und der ϵ -Aminogruppe des Lysins gebildet wird (Hershko und Ciechanover, 1988; Pickart, 2001). Seltener wird ein Ubiquitin an die freie Aminogruppe am N-Terminus eines Proteins, in einem Lysin-unabhängigen Mechanismus, addiert (Ciechanover et al., 1999; Reinsstein et al., 2000; Aviel et al., 2000; Weissman, 2001; Ciechanover und Ben-Saadon, 2004).

Die Addition von Ubiquitin an ein Substratprotein ist ein dreistufiger Prozess, der die Beteiligung von mindestens drei Enzymklassen erfordert, einem Ubiquitin-Aktivierungsenzym (E1), einem Ubiquitin-Konjugationsenzym (E2) und einer Ubiquitin-Protein Ligase (E3) (Johnson et al., 1995; Weissmann, 2001; Hicke, 2001; Haglund et al., 2003; Fang und Weissman, 2004). In einem ersten Schritt, der so genannten Ubiquitinaktivierung, wird dieses an ein E1 Protein, durch die Ausbildung einer Thiol-Ester Bindung zwischen einem Cystein im aktiven Zentrum des E1 und dem endständigen, C-terminalen Glyzin des Ubiquitins, gebunden. Das auf diese Weise aktivierte Ubiquitin wird durch eine Transesterifizierung auf ein Cystein im aktiven Zentrum eines E2 Proteins übertragen. Im dritten Schritt katalysiert eine E3 Ligase die Ausbildung einer Isopeptidbindung zwischen dem Ubiquitin und einem Lysin des Substratproteins (Übersicht in Fang und Weissman, 2004). Die Klasse der E3 Ligasen beherbergt Enzyme die Ubiquitin auf die entsprechenden Substrate übertragen. Dies kann direkt oder über die Bildung eines Ubiquitin-E3 Intermediats geschehen (Übersicht in Weissman, 2001 und in Fang und Weissman, 2004). Eine direkte Übertragung des Ubiquitins auf das Substrat wird durch E3 Ligasen mit einer RING-Finger Domäne katalysiert. Hierbei binden diese an mit Ubiquitin beladene E2 Proteine, was zu einer Konformationsänderung dieses Komplexes führt und einen effizienten Transfer des Ubiquitins zum Substratprotein ermöglicht (Weissman, 2001). E3 Proteine mit einer HECT Domäne hingegen übernehmen das Ubiquitin durch Bindung an ein konserviertes Cystein und bilden somit ein katalytisches Intermediat (Huibregtse et al., 1995). Viele dieser HECT E3s enthalten ein WW-Motiv bestehend aus zwei Tryptophanen als weitere funktionelle Domäne. Diese Domäne dient bei einer Protein-Protein Interaktion der Erkennung zu ubiquitinierender Substrate durch Ausbildung einer hydrophoben Tasche für Prolin-reiche Sequenzen (PPXY oder PPLP), die auch als so genannte Late Domänen beschrieben wurden (Kay et al., 2000; Rotin et al., 2000). Die meisten der WW-Domänen HECT E3s beherbergen noch eine C2 Domäne, die eine Translokation dieses ubiquitinierten Komplexes an die Plasmamembran und möglicherweise eine Interaktion mit Lipid Rafts vermitteln (Plant et al., 2000).

Eine Ubiquitinierung ist aber kein irreversibler Prozess. Es existieren zwei Klassen von Thiol-Proteasen die als Deubiquitinierungsenzyme (DUB) wirken (Wilkinson, 2000) und die

beiden endständigen Glyzine des Ubiquitins als Erkennungssequenz für eine Spaltung nutzen (Gilchrist et al., 1997; Shih et al., 2000). Die Ubiquitin C-terminalen Hydrolasen (UCH) spalten C-terminale Bestandteile vom Ubiquitin während dessen Reifung ab, sowie kleine, an Ubiquitin gebundene, Substrate. Ubiquitin-spezifische Prozessierungsproteasen (UBP) vermitteln die Spaltung gebundener Ubiquitine von größeren Proteinen sowie den Abbau von Polyubiquitinketten (Übersicht in Weissman, 2001 und Fang und Weissman, 2004). Dieser Abbau der an Proteine gebundenen Polyubiquitinketten erfolgt schrittweise um sicherzustellen dass stark ubiquitinierte, und somit für die proteasomale Degradierung markierte, Substrate an das Proteasom assoziiert bleiben.

Neben der Markierung von Proteinen für einen proteasomalen Abbau wirkt Ubiquitin noch in vielfältiger Weise auf die Physiologie der Zelle ein. So kann eine Monoubiquitinierung beispielsweise eine Aktivierung einer Proteinkinase (Deng et al., 2000) oder eine DNA-Reparatur (Hoegel et al., 2002, Pickart et al., 2002) bewirken. Die Sporulation der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wird inhibiert wenn Histone, Bestandteile des Nukleosoms, nicht ubiquitiniert werden (Robzyk et al., 2000), genauso wie der Knospungsvorgang von Retroviren zum Erliegen kommt, wenn beispielsweise bei HIV das Kapsidprotein Gag nicht durch Ubiquitin modifiziert wird (Ott et al., 1998, Hicke, 2001). Eine Depletion des intrazellulären Ubiquitinlevels führt zu einem Verlust der Freisetzung von Viruspartikeln (Strack et al., 2000; Patnaik et al., 2000), die durch eine Fusion eines einzelnen Ubiquitins an das Gag Protein teilweise wieder hergestellt werden kann (Patnaik et al., 2000).

Der oligomere Zustand von Ubiquitin spielt also bei Determination der Funktion eine wesentliche Rolle. Die Bildung von Multimeren wird durch sieben intrinsische Lysine im Ubiquitin ermöglicht. *In vivo* jedoch werden meist nur drei dieser sieben tatsächlich für die Bildung von Polyubiquitinketten genutzt (Pickart, 2001; Weissman, 2001). Während eine Vernetzung der einzelnen Ubiquitine über das Lysin an Aminosäureposition 48 (K48) ein Substrat dem proteasomalen Abbau zuführt (Chau et al., 1989; Hochstrasser, 1996, Voges et al., 1999; Thrower et al., 2000) hat eine Verknüpfung über das Lysin an Position 63 (K63) wiederum andere Funktionen wie beispielsweise eine Auswirkung auf die DNA Reparatur (Spence et al., 1995) oder die Translation (Weissman, 2001). Die Funktion der über K29 vernetzten Polyubiquitinketten ist bislang nicht hinreichend geklärt (Weissman, 2001).

Eine weitere wichtige Funktion des Ubiquitins in monomerer Form ist dessen Fähigkeit durch Bindung an ein membranständiges Protein dieses für eine Endozytose zu markieren und originale Internalisierungssequenzen funktionell zu ersetzen (Terrell et al., 1998; Lucero et al., 2000; Roth und Davis, 2000; Shih et al., 2000; Weissman, 2001; Hicke, 2001; Fang und Weissman, 2004). Hierbei trägt das Ubiquitin selbst das Signal zur Internalisierung (Nakatsu et al., 2000; Roth und Davis, 2000) und kann die Halbwertszeit stabiler Plasmamembranproteine auf der Zelloberfläche um den Faktor 4 verringern (Shih et al., 2000). Eine Ubiquitin-vermittelte Endozytose membranständiger Proteine ist sowohl für das Hefe-System als auch für Säugetierzellen beschrieben worden, beispielsweise für die invariante Kette des IL-2 Rezeptors (Nakatsu et al., 2000), den Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR) (Haglund et al., 2003; Mosesson et al., 2003), epitheliale Na⁺-Kanäle (Bonifacino und Weissman, 1998; Goulet et al., 1998), den α -Rezeptor (Shih et al., 2000) und den „Colony Stimulating Faktor 1“ (Lee et al., 1999). Dabei kann die Monoubiquitinierung an einem oder an mehreren Lysinen gleichzeitig innerhalb eines

Substratproteins stattfinden (Hicke, 2001). So ist für den EGFR beschrieben worden, dass die Stöchiometrie der multiplen Monoubiquitinierung mit der Effizienz der Internalisierung korreliert. Je stärker ein Protein monoubiquitiniert ist, desto besser wird es von den entsprechenden Ubiquitin-Rezeptoren erkannt und wird folglich effizienter endozytiert. Darüber hinaus bietet die multiple Monoubiquitinierung noch einen zusätzlichen Schutz vor DUBs, was einem Recycling des Proteins an die Zelloberfläche entgegenwirkt (Haglund et al., 2003).

Als mechanistisches Modell der Endozytose wird eine Interaktion der monoubiquitinierten Proteine mit Eps15 und Epsinen vorgeschlagen, welche sie an die Maschinerie der Clathrin beschichteten Vesikel (Clathrin coated pits) koppelt (DiFiore et al., 2003). Hierbei binden die Epsine die monoubiquitinierten Membranproteine über ihre UIM (ubiquitin-interacting motif) und zusätzlich noch ein Clathrin-Adapter Molekül, das AP-2 (Salcini et al., 1999; Hofmann und Falquet, 2001; Brett et al., 2002). Auf die Endozytose der Proteine in Clathrin beschichteten Importvesikeln folgt die Bildung eines weiteren Komplexes mit den Proteinen Hrs und dem „signal-transducing adaptor molecule“ (STAM), was zu einer Translokation des Komplexes an das „multi-vesicular bodies“ (MVB) Kompartiment führt, wo sie vom ESCRT Komplex (endosomal sorting complex required for transport) erkannt werden (Raiborg et al., 2002; Katzmann et al., 2002; Bache et al., 2003). Über das MVB-Kompartiment werden die endosomalen Transportvesikel schließlich mit Lysosomen fusioniert, was zur Degradierung der ubiquitinierten Proteine führt (Katzmann et al., 2002).

Neuere Studien widersprechen jedoch der Funktion des Monoubiquitins als starkes Internalisierungssignal (Madhus, 2006). So gelangen die Autoren zu dem Schluß, dass ein einzelnes Ubiquitin alleine nicht ausreicht um eine Endozytose zu induzieren. Vielmehr beschreiben Hawryluk und Kollegen (2006) das Epsin1 ausschließlich Polyubiquitin anstelle des Monoubiquitins über ein Tandem-UIM bindet. Dies führt die Autoren zu der Annahme, dass eine Polyubiquitinkette als Signal für eine Internalisierung wahrscheinlicher ist als Ubiquitin in monomerer Form. Einen ähnlichen Befund erbrachten Barriere und Kollegen (2006). Sie konnten zeigen, dass ein einfaches Ubiquitin kein hinreichend starkes Signal für eine Internalisierung bietet. Vielmehr würden an Oberflächenmoleküle fusionierte Ubiquitine über ihre internen Lysine polyubiquitiniert werden, was schließlich zu einer Aufnahme in endozytotische Vesikel führt. Ein von den Autoren vorgeschlagener Mechanismus zur Ubiquitin-vermittelten Endozytose würde die Anwesenheit von Polyubiquitinketten mit einer Länge von mindestens vier Untereinheiten benötigen, oder eine Oligomerisierung von Plasmamembranproteinen mit multiplen Monoubiquitinen oder kurzen Polyubiquitinketten.

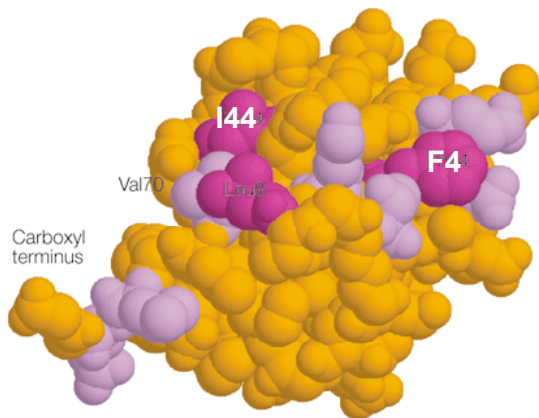


Abbildung 8: Globuläre Struktur des Ubiquitins

In Magenta dargestellt und in weiß hervorgehoben die für die Internalisierung wichtigen Bereiche und Aminosäuren. Die lilafarbenen Aminosäuren spielen eine nur geringe Rolle für die Endozytose. I: Isoleuzin; F: Phenylalanin.

Entnommen aus: Sloper-Mould et al., J. Biol. Chem. Vol. 276, No. 32, pp. 30483-30489, 2001.

Die für die beschriebenen Funktionen essentiellen Domänen des Ubiquitins sind nicht lineare Epitope auf der globulären Oberfläche des Proteins (Abb.8) (Shih et al., 2000; Sloper-Mould et al., 2001). Das Internalisierungssignal wurde zwei hydrophoben Bereichen auf der Oberfläche zugeordnet, wobei das Phenylalanin an Aminosäureposition 4 und das Isoleuzin an Position 44 die entscheidenden Aminosäuren sind (Shih et al., 2000; Sloper-Mould et al., 2001). Mutationen des Phenylalanins hatten stets schwerwiegende Effekte in Bezug auf die Internalisierung, was auf eine wichtige Rolle bei einer Protein-Protein Interaktion während der Endozytose hinweist (Sloper-Mould et al., 2001). Der gleiche hydrophobe Bereich ist auch als essentiell für eine Erkennung durch das Proteasom beschrieben worden (Beal et al., 1996).

Das Ubiquitin-Proteasom System wird von Viren verschiedenster Familien während ihrer Replikation zu ihrem Vorteil genutzt (Übersicht in Chen und Gerlier, 2006). So bindet beispielsweise das RTA Protein der Kaposi-Sarkom Assoziierten Herpesviren (KSHV) den Interferon-regulierenden Faktor IRF7 und induziert dessen Polyubiquitinierung was zu einer Degradierung durch das Proteasom führt. Dies wiederum bewirkt eine Beeinträchtigung des angeborenen Immunsystems durch eine ausbleibende Aktivierung des *IFN- α* Gens (Yu et al., 2005). Einen negativen Einfluß auf den Zellzyklus nimmt das E6 Protein der humanen Papillomviren (HPV) durch Bindung an das Antionkogen p53 (Werness et al., 1990; Li et al., 2005). E6 bindet an eine zelluläre E3 Ligase und induziert somit eine Ubiquitinierung von p53 (Huibregtse et al., 1993; Talis et al., 1998) was zu dessen proteasomalen Degradierung führt. In Folge dessen fehlt ein wichtiges regulatorisches Element der Zellteilung, was in unkontrollierter Proliferation und verhindertem Zelltod infizierter Zellen endet. Lentiviren interagieren in vielfältiger Weise mit dem Ubiquitinsystem. Wie bereits beschrieben wird eine Ubiquitinierung der Gag Proteine für eine Freisetzung viraler Partikel benötigt (Ott et al., 1998). Das Vif Protein hingegen bindet an die Rbx1 E3 Ligase (Yu et al., 2003) und koppelt diese an APOBEC3G und APOBEC3F was zu einer Degradierung dieser antiviralen Proteine führt (Yu et al., 2003; Liu et al., 2005). Ein weiteres lentivirales Protein, das Nef Protein, trägt ein dem Ubiquitin ähnliches Dilysin Motiv, was eine verstärkte Internalisierung vermittelt (Nakatsu et al., 2000). Das Nef Protein vermag sowohl CD4 als auch das Clathrin-Adapter Molekül AP-2 zu binden was in einer stark verminderten Oberflächenexpression von CD4 in infizierten Zellen resultiert (Craig et al., 1998; Bresnahan et al., 1998; Greenberg et al., 1998).

Ubiquitin spielt also in vielen regulatorischen Prozessen eukaryotischer Zellen eine wesentliche Rolle. Es bestimmt in vielerlei Gestalt das Schicksal von Proteinen, indem es sie beispielsweise der proteasomalen Degradierung zuweist oder eine Endozytose vermittelt. Auch ist es an der intrazellulären Sortierung der Proteine durch eine Interaktion mit dem ESCRT Komplex und dem MVB-System beteiligt. Darüber hinaus wechselwirkt es mit viralen Proteinen und nimmt so Einfluß auf deren Replikation.

1.5 Foamyviren und subvirale Partikel

Subvirale Partikel sind von der Zelle abgeleitete membranöse Vesikel, in die virale Hüllproteine eingelagert sind (Modrow und Falke, 2003). Neben Hepadnaviren (Bruss und Ganem, 1991) sind auch Angehörige anderer Familien membranumhüllter Viren in der Lage solche Strukturen von infizierten Zellen zu sezernieren (Rhabdoviren: Rolls et al., 1994; Coronaviren: Vennema et al., 1996; Maeda et al., 1999; Flaviviren: Allison et al., 1995).

Das Typ III Env Vorläuferprotein der Foamyviren (Lindemann et al., 2001; Geiselhart et al., 2003) wird post-translational von einer Furin-ähnlichen Protease in drei Untereinheiten prozessiert (Duda et al., 2004; Geiselhart et al., 2004), die alle partikelassoziiert vorliegen (Lindemann et al., 2001). Für eine Freisetzung foamyviraler Partikel wird eine zelluläre Koexpression von PFV Gag und Env benötigt (Fischer et al., 1998; Pietschmann et al., 2000). Die für diesen Prozess essentiellen Domänen liegen sowohl im Env (MSD in TM und BD in LP) als auch im Gag Protein (Pietschmann et al., 1999; Lindemann et al., 2001). Während Orthoretroviren ohne die Anwesenheit von Env Virus-ähnliche Partikel (VLP) von der Zelle freisetzen können (Rhee et al., 1990; Freed, 1998), ist dies für Foamyviren bislang nicht gezeigt worden.

Shaw und Kollegen (Shaw et al., 2002) gelang jedoch der für Retroviren ungewöhnliche Nachweis von subviralen PFV Partikeln. Hierzu wurden Zellkulturüberstände PFV Env transfizierter Zellen über einem 20%igen Sucrose-Kissen zentrifugiert und somit von zellulären Verunreinigungen getrennt sowie aufkonzentriert. Durch den Nachweis einer NP40-Sensitivität dieser Strukturen konnte auch ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um aggregierte Proteinkomplexe handelt. In ihrer Dichte von 1,11-1,15 g/ml unterschieden sich diese SVP nur unwesentlich von viralen Partikeln. Die Menge an freigesetzten SVP jedoch ist sehr gering.

In unserem Labor (Stanke et al., 2005) durchgeführte Studien über die Natur des foamyviralen Leaderpeptids und dessen höher molekulare Formen, führten zu Mutanten deren im LP liegenden Lysine einzeln oder in Kombinationen durch Arginine ersetzt wurden. Durch die Analyse dieser Hüllproteinmutanten konnte nachgewiesen werden, dass die cytoplasmatische Domäne des LP in starkem Maße ubiquitiniert ist. Alle fünf potentiellen Ubiquitinierungsstellen (K14, K15, K18, K34, K53) schienen tatsächlich auch für eine Modifikation durch Ubiquitin verwendet zu werden. Kombinationsmutanten zeigten in Western Blot Analysen eine insgesamt niedrigere Intensität der Ubiquitin-spezifischen Banden und eine Mutante, die alle Lysine durch Arginine ersetzt trägt (Δ Ubi 1-5), scheint gar nicht mehr ubiquitiniert zu werden. Diese Mutante zeigt eine zum wildtypischen Hüllprotein stärkere Prozessierung des Vorläuferproteins sowie eine zwei- bis dreifache erhöhte Infektiosität. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte für die Kombinations-

mutante (Δ Ubi 1-5) eine massive Bildung subviraler Partikel gezeigt werden, wohingegen für das wildtypische Hüllprotein keine solche Strukturen zu identifizieren waren. Dieser Befund ließ sich durch eine Dichtezentrifugation transfizierter Zellkulturüberstände bestätigen. Die Lysin-Mutante Δ Ubi 1-5 setzt 20- bis 50fach mehr SVP frei als die wildtypische Hüllproteinvariante.

Diese Studien lieferten, meines Wissens nach, die ersten Hinweise für eine Interaktion eines viralen Hüllproteins Proteins mit dem Ubiquitin-System, das nicht in einer Degradierung des Proteins endet (Bültmann et al., 2000), sondern vielmehr dessen Freisetzung von der Zelle in starkem Maße reguliert. Mechanistisch ließe sich die für diese Env-Mutanten um den Faktor 20 bis 50 erhöhte Freisetzung subviraler Partikel möglicherweise durch eine fehlende Internalisierung von der Plasmamembran aufgrund fehlender Ubiquitinierungen erklären.

Diese Studie, sowie die Ergebnisse von Shaw und Kollegen (Shaw et al., 2002) beschreibt erstmalig die Freisetzung subviraler Partikel für Angehörige der Familie der Retroviren. Die Tatsache dass Foamyviren als einzige Retroviren keine VLP, aber SVP freisetzen verdeutlicht erneut die Verwandtschaft dieser Unterfamilie zu den Hepadnaviren, die ebenfalls eine Koexpression des Kapsidproteins mit dem Hüllprotein für die Freisetzung viraler Partikel benötigen, sowie massiv subvirale Partikel sezernieren (Bruss und Ganem, 1991).

1.6 Ziele der Arbeit

Das foamyvirale Hüllprotein wird während dessen Reifung und Transport an die Zelloberfläche in mannigfaltiger Weise posttranslational durch beispielsweise Glykosylierungen und Ubiquitinierungen modifiziert.

Sequenzanalysen des PFV Hüllproteins ergaben 15 potentielle N-Glykosylierungsstellen, wovon fünf evolutionär konserviert sind. Vorangegangene Studien haben zeigen können, dass das Env Protein in hohem Maße durch das Anhängen von Zuckergruppen modifiziert wird. Eine Inaktivierung einzelner NGS hat im Falle dreier evolutionär konservierter N-Glykosylierungsmotive zur Ausbildung deutlicher Phänotypen geführt. So waren Mutanten der 13. und 15. NGS, in der TM Untereinheit, in ihrer Prozessierung des Env Vorläuferproteins und ihrer Partikelfreisetzung stark herabgesetzt. Eine Inaktivierung der 8. NGS, die in der SU Untereinheit liegt, hingegen führte zu einem totalen Verlust der Hüllproteinprozessierung, sowie zu einer nicht mehr nachweisbaren Partikelfreisetzung und Infektiosität. Ob diesem Verlust jeglicher Freisetzung viraler Partikel der $\Delta N8$ Mutante ein Transportdefekt zugrunde liegt, und ob es sich bei der Ausbildung dieser Phänotypen um eine direkte Folge einer fehlenden Glykosylierung oder einer vom Wildtyp abweichenden Aminosäuresequenz handelt, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Dafür wurden für die 8., 13. und 15. NGS neue Mutanten hergestellt, welche jeweils eine andere Aminosäure, des für eine N-Glykosylierung essentiellen Motivs N-X-S/T, durch einen konservativen Austausch ersetzt tragen. Diese Mutanten wurden dann hinsichtlich ihrer Prozessierung, Oberflächenexpression, Infektiosität und Temperatursensitivität getestet.

Eine weitere posttranslationale Modifizierung ist die Ubiquitinierung. Ubiquitin spielt in vielen zellulären Prozessen eine Rolle und nimmt Einfluß auf das Schicksal von Proteinen, indem es sie beispielsweise für den Abbau durch das Proteasom markiert, eine Endozytose induzieren, oder den Transport innerhalb der Zelle bestimmen kann. Für eine Mutante des PFV Env Proteins (ΔUbi 1-5), die in ihrer zytoplasmatischen Domäne des LP nicht mehr ubiquitiniert wird, wurde eine massive Freisetzung subviraler Partikel gezeigt, wohingegen das wildtypische PFV Hüllprotein nur in sehr geringem Maße zur Sekretion von SVP in der Lage ist (Stanke et al. 2005). Dieser Mutante wurden innerhalb des LP alle Lysine durch Arginine ersetzt, wodurch keine Ubiquitinierung mehr stattfinden kann. Der massive Anstieg der Sekretion subviraler Partikel, sowie eine zum Wildtyp erhöhte Infektiosität, dieser Mutante hat gezeigt, dass Ubiquitin direkt an der Regulation der Freisetzung von sowohl subviralen, als auch viralen PFV Partikeln beteiligt ist. Der regulatorische Einfluß, den Ubiquitin auf das foamyvirale Hüllprotein zu nehmen scheint, sollte in dieser Arbeit genauer untersucht werden. Hierfür wurden Mutanten auf Basis der ΔUbi 1-5 Mutante hergestellt, die zum einen Ubiquitin stabil an das Env Protein fusioniert, zum anderen einzelne Lysine im LP an ihren natürlichen Positionen, sowie an Positionen in der Nähe natürlicher Lysine tragen. Über diesen Ansatz sollte die Bedeutung eines Monoubiquitins, sowie bestimmter Lysine im LP für die Endozytose, die Prozessierung und den intrazellulären Transport des Hüllproteins untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Chemikalien

An dieser Stelle wird darauf verzichtet, alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien im Einzelnen zu benennen und aufzulisten. Soweit nicht gesondert vermerkt, wurden alle Produkte von folgenden Firmen bezogen: Merck (Darmstadt, D), Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D), Serva (Heidelberg, D), Roth (Karlsruhe, D) und Applichem (Darmstadt). In bestimmten Fällen wurde darauf Wert gelegt, Produkte einer bestimmten Firma zu verwenden. In solchen Fällen sind an gegebener Stelle im Text Hersteller sowie Katalognummer angegeben.

2.1.2 Enzyme und Reaktionspuffer

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Restriktionsenzyme sowie die zugehörigen Puffer der Firmen MBI-Fermentas (St.Leon-Rot, D) und NEB (Frankfurt a.M., D) verwendet. Darüber hinaus wurden folgende Enzyme verwendet:

Pwo-Polymerase	Peqlab (Erlangen, D)
Klenow-Fragment	MBI-Fermentas (St.Leon-Rot, D)
RNaseA	Roth (Karlsruhe, D)
Taq-Polymerase	Peqlab (Erlangen, D)
T4-DNA-Ligase	MBI-Fermentas (St.Leon-Rot, D)

2.1.3 Größen- und Längenstandards

Nukleinsäurestandards	
GeneRuler 1kb DNA Ladder	MBI-Fermentas (St.Leon-Rot, D)
GeneRuler 100bp DNA Ladder	MBI-Fermentas (St.Leon-Rot, D)
Proteinstandards	
Prestained Protein Ladder, 10-170kD	MBI-Fermentas (St.Leon-Rot, D)

2.1.4 Antibiotika

Zur Inkubation und Selektion verschiedener Zelllinien und Bakterienstämme wurden folgende Antibiotika verwendet

	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampizillin	100mg/ml	100µg/ml

Penizillin/Streptomycin GIBCO™ (Invitrogen, Kat.Nr. 5140122)	10mg/ml	10µg/ml
--	---------	---------

2.1.5 Bakterienstämme

Aufgeführt werden die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme. Für eine Transformation von Ligationsansätzen der DH5α-Stamm, ob seiner hohen Transformationseffizienz verwendet wurde, wohingegen der JM109-Stamm für die Präparation größerer DNA-Mengen Verwendung fand.

DH5α	F- ϕ 80d <i>lacZ</i> ΔM15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , λ - <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (rk--mk+) <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>phoA</i> , <i>deoR</i> , Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169	Invitrogen (Karlsruhe, D)
JM109	<i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> (rk ⁻ ,mk ⁺), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , Δ(<i>lac-proAB</i>), [F', <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacIq</i> ZΔM15]	Stratagene (Amsterdam, NL)

2.1.6 Zelllinien

Zelllinie	Charakteristika	Referenz
293T	Humane embryonale Nieren-Epithelzelllinie, exprimiert das große SV40 T-Antigen (ATCC: CRL-1573)	DuBridge et al., 1987
HT1080	Humane Fibrosarkomzellen (ATCC: CCL-121)	Rasheed et al., 1974
HT1080 NLS-LacZ	Humane Fibrosarkomzellen die stabil lacZ mit einem Kernlokalisationsignal exprimieren	Pietschmann et al., 2000

2.1.7 Antikörper/Antiseren

Primäre Antikörper	Verdünnung	Referenz
Kaninchen-α-PFV LP 1-86 (polyklonal)	1:200	Lindemann et al., 2001
Kaninchen-α-PFV Gag 936 (polyklonal)	1:1000	Duda et al., 2004
Kaninchen-α-PFV LP/SU	1:300	Lindemann et al., 2001
Maus-α-PFV SU P3E10 (Hybridomaüberstand)	1:25	Duda et al., 2004
Maus-α-Ubiquitin	1:200	Covance (Berkeley, CA, USA)
Maus-α-Ubiquitin P4D1	1:25	Duda et al., 2006 Yu et al., 2006

sekundäre Antikörper	Verdünnung	Referenz
Ziege-α-Kaninchen IgG,	1:1000	Dako (Hamburg, D)

HRP-konjugiert		
Ziege- α -Maus IgG, HRP-konjugiert	1:1000	Dako (Hamburg, D)

Antikörper für die Mikroskopie	Verdünnung	Referenz
Alexa 633 Ziege- α -Maus IgG (Kat.Nr. A21052)	1:2000	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Alexa 546 Ziege- α -Maus IgG (Kat.Nr. A11030)	1:2000	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Alexa 488 Ziege- α -Maus IgG (Kat.Nr. A11029)	1:2000	Invitrogen (Karlsruhe, D)

2.1.8 Oligonukleotide

Nr.	5'-3' Sequenz	Bemerkung
312	aaattagcattattagcaatgtttctg	rückwärts Primer, bindet im 5'-Bereich von PFV Env
391	aagagcagattgaaagagcaaaagc	vorwärts Primer, bindet 5' des Translationsstarts des IP in PFV Env
393	caattcctgttagagcagaag	rückwärts Primer, bindet 5' der SD Region im PFV Env
487	cactgcttactggcttatcg	vorwärts Primer, bindet im 3'-Bereich eines CMV-Promotors
525	gtggaggtaaatatgactagtattc	vorwärts Primer, bindet 5' der Kpn2I Schnittstelle im PFV Env
531	caacactAGTtctttcctattattac	rückwärts Mutageneseprimer, bindet im Bereich der PFV Env SU/TM Spaltstelle und inaktiviert diese
594	gtcgctgagtagtgcgcgagc	vorwärts Primer, bindet im CMV Promotor, 5' der MfeI Schnittstelle
633	gcctctagagatgaaaacttacagcaaggaa	vorwärts Primer, bindet in der TM Domäne des PFV Env
810	ttcagttaacaacttcttacttctgtgtcaaCtG agcattat	vorwärts Mutageneseprimer, bindet im Bereich der 4. NGS im PFV Env und inaktiviert diese (N ₁₈₃ >Q)
815	caaaacgagcggttctgcttaataaactaaat CaGcttacatc	vorwärts Mutageneseprimer, bindet im Bereich der 7. NGS im PFV Env und inaktiviert diese (N ₃₄₆ >Q)
825	ccctagtaacCtGgggataggaa	rückwärts Mutageneseprimer, bindet im Bereich der 12. NGS im PFV Env und inaktiviert diese (N ₅₅₆ >Q)
830	cgtagctgttCaGgaaacaacgtc	vorwärts Mutageneseprimer, bindet im Bereich der 15. NGS im PFV Env und inaktiviert diese (N ₈₃₃ >Q)

1313	tggagagacgcataccgttg	vorwärts Mutageneseprimer, bindet im Bereich der 8. NGS im PFV Env und inaktiviert diese (NTS>NTV)
1314	taagcatcatcctgggtggac	rückwärts Mutageneseprimer, bindet im Bereich der 8. NGS im PFV Env und inaktiviert diese (NTS>NTV)
1315	tagttccaataagcatcatcctggg	vorwärts Mutageneseprimer, bindet im Bereich der 13. NGS im PFV Env und inaktiviert diese (NSS>NSV)
1316	tgatgaactctccctagagg	rückwärts Mutageneseprimer, bindet im Bereich der 13. NGS im PFV Env und inaktiviert diese (NSS>NSV)
1317	tacgggagctcaccactgctcgctgcg	vorwärts Mutageneseprimer, bindet im Bereich der 13. NGS im PFV Env und inaktiviert diese (NET>NEA)
1318	tagcgagcagtggtagctcccgtag	rückwärts Mutageneseprimer, bindet im Bereich der 13. NGS im PFV Env und inaktiviert diese (NET>NEA)
2031	gcgcatgaggcacttcaaaa	vorwärts Primer, bindet im Bereich der PFV LP Domäne
2112	ccaagtctccacccattgacg	vorwärts Primer, bindet im CMV Promotor, 5' der Transskriptions-initiationsstelle
2195	ctactattgaatGTTtcatactattcc	vorwärts Mutageneseprimer, bindet im Bereich der 8. NGS im PFV Env und führt eine Mutation ein (NTS>NVS)
2196	ggaatagtagaAACattcaatagtag	rückwärts Mutageneseprimer, bindet im Bereich der 8. NGS im PFV Env und führt eine Mutation ein (NTS>NVS)
2197	ggcaatGTCtcagacacgagtg	vorwärts Mutageneseprimer, bindet im Bereich der 13. NGS im PFV Env und führt eine Mutation ein (NSS>NVS)
2198	cactcgtgtctgaGACattgcc	rückwärts Mutageneseprimer, bindet im Bereich der 13. NGS im PFV Env und führt eine Mutation ein (NSS>NVS)
2199	actgttaatCAAacaacgcatgc	vorwärts Mutageneseprimer, bindet im Bereich der 15. NGS im PFV Env und führt eine Mutation ein (NET>NQT)
2200	gcatgacgttgtTTGattaacagt	rückwärts Mutageneseprimer, bindet im Bereich der 15. NGS im PFV Env und führt eine Mutation ein (NET>NQT)
2287	ccccccCGTCTCcatcagcATGCAaATCTTCGTGAAGACCC	vorwärts Primer, bindet an den Ubiquitin Translationsstart und ersetzt eine natürliche BglII- durch eine BsmBI-Schnittstelle

2288	cccgccgtgccgccgccAGATCTCCCA CCTCTtAGACGGAGGA	rückwärts Primer, bindet im Bereich der Translationsstops von Ubiquitin, ersetzt eine natürliche BsmBI- durch eine BglII Schnittstelle, trägt einen Teil eines G/S-Linkers
2289	tgcGGATCCcccgccgccgtcccccccc cgccgctgccgccgccA	rückwärts Primer, trägt einen Teil eines G/S-Linkers, kodiert für eine BglII-Schnittstelle
2290	gggGGATCCGCACCACCAATGAC ACTGCAA	vorwärts Primer, bindet an den 5' Bereich von PFV Env und kodiert für eine BamHI-Schnittstelle zur Herstellung von Fusionsproteinen
2291	cccGGATCCctgattcttcttttcgtagga	rückwärts Primer, bindet an die 3' Region des PFV Env, trägt eine BamHI-Schnittstelle zur Herstellung von Fusionsproteinen
2292	agcggcgggcgggggcagcAGATCTCAa ATCTTCGTGAAGACCCTGA	vorwärts Primer, bindet im Bereich des Translationsstarts von Ubiquitin, trägt einen Teil eines G/S-Linkers
2293	cagGGATCCggggggcgggcggcagcggc ggggcgggagcggcgggggggcagcA	vorwärts Primer für das N-term. Anhängen eines G/S-Linkers an Ubiquitin, trägt 5' eine BamHI- und 3' eine BglII-Schnittstelle
2294	cccGAATTctaTCTtAGACGGAGGA CCAGGTG	rückwärts Primer, bindet im Bereich des Translationsstops von Ubiquitin, inaktiviert eine BsmBI-Schnittstelle
2347	gccgccAGATCTcaggtcctcctcgagat cagcttctgctcTCTTAGACGGAGGAC CA	rückwärts Primer, bindet im 3' Bereich von Ubiquitin, kodiert für einen myc-tag
2348	gccgccAGATCTgggcccaccTCTt	rückwärts Primer, führt zwischen Ubiquitin und G/S-Linker ein Prolin ein
2349	GCAGAATTCctacaggtcctcctcgaga tcagcttctgctcTCTTAGACGGAGGA CCA	rückwärts Primer, kodiert für einen myc-tag und bindet im pczHFVenvEM154
2381	gaagtcctcatgcgctCtattCATtCttTcc aatg	rückwärts Mutageneseprimer, bindet im pczHFVenvEM140 LP (R ₁₄ >K)
2382	gaagtcctcatgcgctCtattCATtTttCtcc aa	rückwärts Mutageneseprimer, bindet im pczHFVenvEM140 LP (R ₁₅ >K)
2383	gaagtcctcatgcgctTtattCAT	rückwärts Mutageneseprimer, bindet im pczHFVenvEM140 LP (R ₁₈ >K)
2384	ctgaacagcagAAGgaacaaattat	vorwärts Mutageneseprimer, bindet im pczHFVenvEM140 LP (R ₃₄ >K)
2385	ataatttggtcCTTctgctgttcag	rückwärts Mutageneseprimer, bindet im pczHFVenvEM140 LP (R ₃₄ >K)
2386	ctaggagagatAAAttagatatctg	vorwärts Mutageneseprimer, bindet im pczHFVenvEM140 LP (R ₅₃ >K)

2387	cagatatctaaaTTTatctctcctag	rückwärts Mutageneseprimer, bindet im pczHFVenvEM140 LP (R ₅₃ >K)
2398	cgccagccgtctcatcagcATGcaaactgccgtga	vorwärts Primer zur Amplifikation von Ubi F4A, trägt eine BsmBI-Schnittstelle
2399	cgccagccgtctcatcagcATGcaaactctcg tga	vorwärts Primer zur Amplifikation von Ubi, trägt eine BsmBI-Schnittstelle
2477	catttggaGaaGaAAGaataGagc	vorwärts Mutageneseprimer, bindet im pczHFVenvEM140 LP (M ₁₆ >K)
2478	tcatgcgctCtattCTTtCttCtc	rückwärts Mutageneseprimer, bindet im pczHFVenvEM140 LP (M ₁₆ >K)
2479	catttggaGaaGaAtGaaAaGagc	vorwärts Mutageneseprimer, bindet im pczHFVenvEM140 LP (N ₁₇ >K)
2480	gcctcatgcgctCtttCaTtCttC	rückwärts Mutageneseprimer, bindet im pczHFVenvEM140 LP (N ₁₇ >K)
2481	tggaGaaGaATGaataGaAAGcatgagg	vorwärts Mutageneseprimer, bindet im pczHFVenvEM140 LP (A ₁₉ >K)
2482	tgaagtgcctcatgcTTtCtattCATtCt	rückwärts Mutageneseprimer, bindet im pczHFVenvEM140 LP (A ₁₉ >K)
2483	aATGaataGagcgAaAgaggcacttcaaaa	vorwärts Mutageneseprimer, bindet im pczHFVenvEM140 LP (H ₂₀ >K)
2484	tgtattttgaagtgcctcTtTcgctCtattC	rückwärts Mutageneseprimer, bindet im pczHFVenvEM140 LP (H ₂₀ >K)
2485	cacttcaaaatacaaAaactgtgactg	vorwärts Mutageneseprimer, bindet im pczHFVenvEM140 LP (T ₂₇ >K)
2486	tgctgttcagtcacagttTttgtattttg	rückwärts Mutageneseprimer, bindet im pczHFVenvEM140 LP (T ₂₇ >K)

2.1.9 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide werden unterschieden in bereits vorhandene und im Rahmen dieser Arbeit hergestellte.

2.1.9.1 Vorhandene Plasmide

Plasmidname	Beschreibung	Referenz
pcDNA3.1zeo	Expressionsvektor mit SV40 ori, CMV Promotor, MCS, bGH-Poly-A-Signal, Amp ^R , Zeo ^R	Invitrogen (Karlsruhe, D)
pER-YFP	CMV-Enhancer/Promotor getriebenes Expressionsplasmid für einen an YFP fusionierten ER-Marker	Clontech (Mountain View, CA, USA)
pGolgi-YFP	CMV-Enhancer/Promotor getriebenes Expressionsplasmid für einen an YFP fusionierten Golgi-Marker (N-terminale 81 AS der humanen beta 1,4-Galactosyltransferase)	Clontech (Mountain View, CA, USA)

pRab5-GFP	CMV-Enhancer/Promotor getriebenes Expressionsplasmid für Rab5, einen Marker für frühe Endosomen mit fusioniertem GFP	Sönnichsen & Zerial, 2000
pRab7-GFP	CMV-Enhancer/Promotor getriebenes Expressionsplasmid für Rab7, einen Marker für späte Endosomen mit fusioniertem GFP	Barbero et al., 2002
pVLP18-GFP	CMV-Enhancer/Promotor getriebenes Expressionsplasmid für VLP18, einen ER Marker mit fusioniertem GFP	Rolls & Rapoport, 1999
pGag 1-648CGFPHH	CMV-Enhancer/Promotor getriebenes Gag Expressionsplasmid mit C-terminal fusioniertem G/S-Linker, GFP, His-tag und HA-tag	Stange, unveröffentlicht
pczmCherry	CMV-Enhancer/Promotor getriebener Expressionsvektor für das rot fluoreszierende monomere Protein Cherry	Shaner et al., 2004
pczHFVenvEM002	CMV Promotor/Enhancer getriebenes Expressionsplasmid für wildtypisches PFV Env mit inaktiviertem internen SA/SD und Bel-1/Tas Transkriptionsstart	Lindemann und Rethwilm, 1998
pczHFVenvEM020	Auf pczHFVenvEM002 basierendes Env-Expressionskonstrukt mit inaktiverter SU/TM-Proteaseschnittstelle (R ₅₇₁ >T)	Pietschmann et al., 2000
pczHFVenvEM052	Auf pczHFVenvEM002 basierendes Env-Expressionskonstrukt mit einer W _{10,13} >A Mutation	Lindemann et al., 2001
pczHFVenvEM58	Auf pczHFVenvEM002 basierendes Env-Expressionskonstrukt mit inaktiverter 1. NGS (N ₂₅ >Q)	Duda et al., 2004
pczHFVenvEM77	Auf pczHFVenvEM002 basierendes Env-Expressionskonstrukt mit inaktiverter 2. NGS (N ₁₀₉ >Q)	Duda et al., 2004
pczHFVenvEM78	Auf pczHFVenvEM002 basierendes Env-Expressionskonstrukt mit inaktiverter 3. NGS (N ₁₄₁ >Q)	Duda et al., 2004
pczHFVenvEM105	Auf pczHFVenvEM002 basierendes Env-Expressionskonstrukt mit inaktiverter 4. NGS (N ₁₈₃ >Q)	Lüftenegger et al., 2005
pczHFVenvEM106	Auf pczHFVenvEM002 basierendes Env-Expressionskonstrukt mit inaktiverter 5. NGS (N ₂₈₆ >Q)	Lüftenegger et al., 2005
pczHFVenvEM107	Auf pczHFVenvEM002 basierendes Env-Expressionskonstrukt mit inaktiverter 6. NGS (N ₃₁₁ >Q)	Lüftenegger et al., 2005

pczHFVenvEM108	Auf pczHFVenvEM002 basierendes Env-Expressionskonstrukt mit inaktiverter 7. NGS (N ₃₄₆ >Q)	Lüftenegger et al., 2005
pczHFVenvEM109	Auf pczHFVenvEM002 basierendes Env-Expressionskonstrukt mit inaktiverter 8. NGS (N ₃₉₁ >Q)	Lüftenegger et al., 2005
pczHFVenvEM110	Auf pczHFVenvEM002 basierendes Env-Expressionskonstrukt mit inaktiverter 9. NGS (N ₄₀₅ >Q)	Lüftenegger et al., 2005
pczHFVenvEM111	Auf pczHFVenvEM002 basierendes Env-Expressionskonstrukt mit inaktiverter 10. NGS (N ₄₂₃ >Q)	Lüftenegger et al., 2005
pczHFVenvEM112	Auf pczHFVenvEM002 basierendes Env-Expressionskonstrukt mit inaktiverter 11. NGS (N ₅₂₇ >Q)	Lüftenegger et al., 2005
pczHFVenvEM113	Auf pczHFVenvEM002 basierendes Env-Expressionskonstrukt mit inaktiverter 12. NGS (N ₅₅₆ >Q)	Lüftenegger et al., 2005
pczHFVenvEM114	Auf pczHFVenvEM002 basierendes Env-Expressionskonstrukt mit inaktiverter 13. NGS (N ₇₈₂ >Q)	Lüftenegger et al., 2005
pczHFVenvEM115	Auf pczHFVenvEM002 basierendes Env-Expressionskonstrukt mit inaktiverter 14. NGS (N ₈₀₈ >Q)	Lüftenegger et al., 2005
pczHFVenvEM116	Auf pczHFVenvEM002 basierendes Env-Expressionskonstrukt mit inaktiverter 15. NGS (N ₈₃₃ >Q)	Lüftenegger et al., 2005
pczHFVenvEM134	Auf pczHFVenvEM002 basierendes Env-Expressionskonstrukt mit K _{14,15,18} >R-Mutation	Stanke et al., 2005
pczHFVenvEM141	Auf pczHFVenvEM002 basierendes Env-Expressionskonstrukt mit K _{15,18} >R-Mutation	Lindemann, unveröffentlicht
pczHFVenvEM140	Auf pczHFVenvEM002 basierendes Env-Expressionskonstrukt mit K _{14,15,18,34,53} >R-Mutation	Stanke et al., 2005
pczHFVenvEM236	Auf pczHFVenvEM140 basierendes Env-Expressionskonstrukt mit N-terminal fusioniertem Cherry-Protein	Stirnagel, unveröffentlicht
pczHFVenvEM238	Auf pczHFVenvEM002 basierendes Env-Expressionskonstrukt mit N-terminal fusioniertem Cherry-Protein	Stirnagel, unveröffentlicht
pczHFVenvEM240	Auf pczHFVenvEM002 basierendes Env-Expressionskonstrukt mit inaktiverter SU/TM	Stirnagel, unveröffentlicht

	Proteaseschnittstelle und N-terminal fusioniertem Cherry-Protein	
pczHFVenvEM241	Auf pczHFVenvEM052 basierendes Env-Expressionskonstrukt mit inaktiverter SU/TM Proteaseschnittstelle und N-terminal fusioniertem Cherry-Protein und W _{10,13} >A Mutation	Stirnagel, unveröffentlicht
pczHFVenvEM242	Auf pczHFVenvEM147 basierendes Env-Expressionskonstrukt mit N-terminal fusioniertem Cherry-Protein	Stanke, unveröffentlicht
pczHFVenvEM243	Auf pczHFVenvEM147 basierendes Env-Expressionskonstrukt mit N-terminal fusioniertem Cherry-Protein und inaktiverter SU/TM Spaltstelle	Stanke, unveröffentlicht
pMH118	Auf pcDNA3.1zeo basierender, Env-deletierter, PFV Vektor mit interner eGFP/Neo Expressionskassette unter Kontrolle eines SFFV U3 Promotors	Leurs et al., 2003
pMH120	Auf pcDNA3.1zeo basierender, Env-deletierter, PFV Vektor mit interner lacZ Expressionskassette unter Kontrolle eines SFFV U3 Promotors	Lüftenegger et al., 2005
pczDWP001	Auf pcDNA3.1zeo basierender PFV Vektor mit mutierten env-Translationsstartkodons im Bereich der Env/Pol-ORF Überlappung und interner eGFP/Neo Expressionskassette unter Kontrolle eines SFFV U3 Promotors	Duda et al., 2004
pczHSRV2 wt	Expressionsplasmid für ein CMV getriebenes PFV Provirus	Moebes et al., 1997

2.1.9.2 Hergestellte Plasmide

Plasmidname	Beschreibung	Referenz
pczHFVenvEM131	Auf pczHFVenvEM002 basierendes Env-Expressionsplasmid mit inaktiverter 8. NGS (NTS ₃₉₃ >NTV ₃₉₃)	Lüftenegger et al., 2005
pczHFVenvEM132	Auf pczHFVenvEM002 basierendes Env-Expressionsplasmid mit inaktiverter 13. NGS (NSS ₇₈₄ >NSV ₇₈₄)	Lüftenegger et al., 2005
pczHFVenvEM133	Auf pczHFVenvEM002 basierendes Env-Expressionsplasmid mit inaktiverter 15. NGS (NET ₈₃₅ >NEA ₈₃₅)	Lüftenegger et al., 2005
pczHFVenvEM145	Auf pczHFVenvEM140 basierendes Env-Expressionsplasmid mit R ₁₄ >K	Lüftenegger, unveröffentlicht

	Rückmutation	
pczHFVenvEM146	Auf pczHFVenvEM140 basierendes Env-Expressionsplasmid mit R ₁₅ >K Rückmutation	Lüftenegger, unveröffentlicht
pczHFVenvEM147	Auf pczHFVenvEM140 basierendes Env-Expressionsplasmid mit R ₁₈ >K Rückmutation	Lüftenegger, unveröffentlicht
pczHFVenvEM148	Auf pczHFVenvEM140 basierendes Env-Expressionsplasmid mit R ₃₄ >K Rückmutation	Lüftenegger, unveröffentlicht
pczHFVenvEM149	Auf pczHFVenvEM140 basierendes Env-Expressionsplasmid mit R ₅₈ >K Rückmutation	Lüftenegger, unveröffentlicht
pczHFVenvEM151	Auf pczHFVenvEM002 basierendes Env-Expressionsplasmid mit modifizierter 8. NGS (NT ₃₉₂ S>NV ₃₉₂ S)	Lüftenegger et al., 2005
pczHFVenvEM152	Auf pczHFVenvEM002 basierendes Env-Expressionsplasmid mit modifizierter 13. NGS (NS ₇₈₃ S>NV ₇₈₃ S)	Lüftenegger et al., 2005
pczHFVenvEM153	Auf pczHFVenvEM002 basierendes Env-Expressionsplasmid mit modifizierter 15. NGS (NE ₈₃₄ T>NQ ₈₃₄ T)	Lüftenegger et al., 2005
pczHFVenvEM154	Auf pczHFVenvEM140 basierendes Env-Expressionsplasmid mit C-terminal fusioniertem G/S-Linker + Ubiquitin	Lüftenegger, unveröffentlicht
pczHFVenvEM155	Auf pczHFVenvEM140 basierendes Env-Expressionsplasmid mit N-terminal fusioniertem Ubiquitin + G/S-Linker	Lüftenegger, unveröffentlicht
pczHFVenvEM156	Auf pczHFVenvEM140 basierendes Env-Expressionsplasmid mit N-terminal fusioniertem Ubiquitin + myc-tag + G/S-Linker	Lüftenegger, unveröffentlicht
pczHFVenvEM157	Auf pczHFVenvEM140 basierendes Env-Expressionsplasmid mit N-terminal fusioniertem Ubiquitin + Prolin + G/S-Linker	Lüftenegger, unveröffentlicht
pczHFVenvEM158	Auf pczHFVenvEM140 basierendes Env-Expressionsplasmid mit C-terminal fusioniertem G/S-Linker + Ubiquitin + myc-tag	Lüftenegger, unveröffentlicht
pczHFVenvEM190	Auf pczHFVenvEM156 basierendes Env-Expressionsplasmid mit mutiertem Ubiquitin (F ₄ >A)	Lüftenegger, unveröffentlicht

pczHFVenvEM191	Auf pczHFVenvEM156 basierendes Env-Expressionsplasmid mit mutiertem Ubiquitin (I ₄₄ >A)	Lüftenegger, unveröffentlicht
pczHFVenvEM192	Auf pczHFVenvEM156 basierendes Env-Expressionsplasmid mit mutiertem Ubiquitin (K ₄₈ >R)	Lüftenegger, unveröffentlicht
pczHFVenvEM193	Auf pczHFVenvEM156 basierendes Env-Expressionsplasmid mit mutiertem Ubiquitin (K ₆₃ >R)	Lüftenegger, unveröffentlicht
pczHFVenvEM195	Auf pczHFVenvEM140 basierendes Env-Expressionsplasmid mit einer M ₁₆ >K Mutation	Lüftenegger, unveröffentlicht
pczHFVenvEM196	Auf pczHFVenvEM140 basierendes Env-Expressionsplasmid mit einer N ₁₇ >K Mutation	Lüftenegger, unveröffentlicht
pczHFVenvEM197	Auf pczHFVenvEM140 basierendes Env-Expressionsplasmid mit einer A ₁₉ >K Mutation	Lüftenegger, unveröffentlicht
pczHFVenvEM198	Auf pczHFVenvEM140 basierendes Env-Expressionsplasmid mit einer H ₂₀ >K Mutation	Lüftenegger, unveröffentlicht
pczHFVenvEM199	Auf pczHFVenvEM140 basierendes Env-Expressionsplasmid mit einer T ₂₇ >K Mutation	Lüftenegger, unveröffentlicht

2.1.10 Kommerzielle Methodenkits

Kit	Verwendungszweck	Hersteller
ABI Prism Big Dye Kit	Sequenzier-PCR	PE Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
ECL Plus Westernblot Detection Kit	Immunoblot Entwicklung	Amersham Biosciences (Freiburg, D)
MultiScreen 96-Well Filtration Plate Dye Terminator Removal Kit	Sequenzierprobenaufreinigung	Millipore (Schwalbach, D)
GeneClean Turbo Kit	DNA-Gelextraktion	Qiagen (Düsseldorf, D)

2.1.11 Sonstige Materialien

Watman-Filterpapier	Schleicher und Schüll (Dassel, D)
Nitrozellulosemembran (Hybond™)	Amersham Biosciences (Freiburg, D)

FuGene HD Transfektionsreagenz	Roche (Basel, CH)
Polyfect Transfektionsreagenz	Qiagen (Düsseldorf, D)
Polyethylenimin (PEI)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Streptavidin HRP-konjugiert (Kat.Nr. 21126)	Pierce (Rockford, IL, USA)
Biotin-NHS, wasserlöslich (Kat.Nr. 203118)	Calbiochem/Merck (Darmstadt, D)
dNTPs	MBI-Fermentas (Hamburg, D)
Protein-A-Sepharose	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Biotinylated Protein Ladder (Kat.Nr. 7727)	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
L- ⁽³⁵⁾ S Methionin/Cystein (Kat.Nr. IS103, 5mCi)	Hartmann (Braunschweig, D)

2.2 Puffer und Lösungen

2.2.1 Kulturmedien und Lösungen für die Bakterienkultur

5x LB Medium (flüssig):	für 400ml
LB Broth Base (Invitrogen, Kat.Nr. 12780029)	40g
mit A. dest. auffüllen, autoklavieren	
LB Agar (fest):	für 1l
Difco LB Agar (BD, Kat.Nr. 244520)	40g
mit A. dest. auffüllen, autoklavieren	
SOC-Medium	für 500ml
2% Bacto Trypton	10g
0,5% Bacto yeast extract	2,5g
10mM NaCl	0,29g
2,5mM KCl	1,25ml [5M]
10mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O	5ml [1M]
10mM MgSO ₄ x 7 H ₂ O	5ml [1M]
20mM Glukose	10ml [1M]
mit A. dest. auffüllen, autoklavieren	

1.1.2 Kulturmedien und Lösungen für die Zellkultur

D-MEM

Dulbecco's Modified Eagle Medium mit GlutaMAX I, Natriumpyruvat, Pyridoxin, D-Glucose (4500mg/l) von GIBCO™ (Invitrogen, Kat.Nr. 31966-021)

D-MEM komplett

D-MEM mit fötalem Rinderserum (GIBCO™, Invitrogen, Kat.Nr. 10270-106), Endkonzentrationen: 10%, 12% und 15%

Trypsin-EDTA

0,5g/l Trypsin und 0,2g/l EDTA in modifizierter Puck's Salzlösung A, ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} , mit Phenolrot (GIBCO™, Invitrogen, Kat.Nr. 25300054)

PBS

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, pH 7,4, ohne CaCl_2 und MgCl_2
(Invitrogen, Kat.Nr. 10010015)

2M CaCl_2		für 100ml
2M	CaCl_2	22,2g
mit A.dest. auffüllen, 0,45µm filtrieren		

2x HBS		für 500ml
282mM	NaCl	8,18g
4mM	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,2g
50mM	Hepes	5,95g
mit A. Dest. auffüllen, 0,45µm filtrieren		

50x Natriumbutyrat		für 100ml
500mM	Natriumbutyrat	5,5g
mit sterilem PBS auffüllen, 0,45µm filtrieren		

PBS ⁺⁺		für 500ml
0,9mM	CaCl_2	1,1ml [0,5M]
0,5mM	MgCl_2	0,25ml [1M]
mit sterilem PBS auffüllen		

TSA		für 500ml
10mM	Tris/HCl, pH8	5ml [1M]
140mM	NaCl	4,09g
0,025%	Na-Azid	0,125g
mit A. dest. auffüllen		

Lysepuffer I		für 100ml
100mM	Glyzin	0,75g
1%	Triton X100	1ml
0,1%	SDS	1ml [10%]
0,5mg/ml	EDTA	0,05g
mit TSA auffüllen		

Lysepuffer II		für 100ml (10x)
10mM	Tris/HCl, pH8	10ml [1M]
140mM	NaCl	8,2g

0,025%	Na-Azid	0,25g
1%	Triton X100	10ml
mit A. dest. auffüllen, zum Gebrauch 10fach mit A.dest. verdünnen		

Einfriermedium
10% DMSO in FCS

lacZ-Fixierlösung		für 1l
2%	37% Formaldehyd	54,1ml
0,2%	25% Glutaraldehyd	8,1ml
mit PBS auffüllen		

lacZ-Färbelösung		für 10ml
4mM	K ₃ Fe(CN) ₆	100µl [400mM]
4mM	K ₄ Fe(CN) ₆	100µl [400mM]
2mM	MgCl ₂	200µl [100mM]
0,4mg/ml	X-Gal	200µl [20mg/ml]
mit PBS direkt vor Gebrauch frisch ansetzen		

2.2.3 Puffer und Lösungen zur Analyse und Klonierung von DNA

Plasmidpräparationslösung I		für 250ml
50mM	Glukose	12,5ml [1M]
25mM	Tris/HCl, pH8	6,25ml [1M]
10mM	Na ₂ EDTA, pH8	5ml [0,5M]
mit A. dest. auffüllen		

Plasmidpräparationslösung II		für 250ml
1%	SDS	25ml [10%]
200mM	NaOH	10ml [5M]
mit A. dest. auffüllen		

Plasmidpräparationslösung III		für 200ml
3M	KAc	120ml [5M]
mit konzentrierter Essigsäure auf pH4,8 einstellen ca. 23ml		
mit A. dest. auffüllen		

TE-Puffer		für 50ml
10mM	Tris/HCl, pH8	0,5ml [1M]
1mM	Na ₂ EDTA	0,1ml [0,5M]
mit A. dest auffüllen		

TAE-Puffer		für 1l (50x)
40mM	Tris-Base	242g
1mM	Na ₂ EDTA, pH8	100ml [1M]

20mM	konz. Essigsäure	57,1ml
mit A.dest. auffüllen, zum Gebrauch 50fach mit A. dest. verdünnen		

10x DNA-Probenpuffer		für 100ml
0,25%	Bromphenolblau	250mg
0,25%	Xylene Cyanol	250mg
100mM	Tris/HCl, pH8	10ml [1M]
50mM	Na ₂ EDTA, pH8	1ml [0,5M]
60%	Glycerol	60ml
mit A. dest. auffüllen		

2.2.4 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden

10x PBS		für 1l
137mM	NaCl	80g
2,7mM	KCl	2g
6,5mM	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	11,5g
1,5mM	KH ₂ PO ₄	2g
mit A. dest. auffüllen, zum Gebrauch 10fach mit A. dest. verdünnen		

2x PPC		für 50ml
100mM	Tris/HCl, pH6,8	5ml [1M]
24%	Glycerol	12ml
8%	SDS	4g
0,02%	Coomassie blue G-250	0,01g
2%	β-Mercaptoethanol	1ml
mit A. dest. auffüllen		

20% Saccharoselösung		für 200ml
584mM	Saccharose	40g
mit PBS auffüllen, 0,45µm filtrieren		

Tricine Gel Puffer		für 500ml
3M	Tris-Base	181,5g
0,3%	SDS	15ml [10%]
mit konz. HCl auf pH8,45 einstellen, mit A.dest auffüllen		

Anodenpuffer		für 1l (10x)
0,2M	Tris-Base	242,3g
mit konz. HCl auf pH8,9 einstellen, mit A. dest. auffüllen		
zum Gebrauch 10fach mit A. dest. verdünnen		

Kathodenpuffer		für 1l (5x)
0,1M	Tris-Base	60,75g

Material und Methoden

0,1M	Tricine	89,6g
0,1%	SDS	50ml [10%]
mit A. dest. auffüllen, zum Gebrauch 5fach mit A. dest. verdünnen		
Transferpuffer		für 1l
48mM	Tris-Base	5,81g
39mM	Glyzin	2,93g
0,037%	SDS	3,7ml [10%]
20%	Methanol	200ml
mit A. dest. auffüllen		
PBS-T		für 1l
10x PBS 10fach mit A. dest. verdünnen,		
Zugabe von 0,5% Tween20		5ml
Blocklösung		für 1l
5% Milchpulver		50g
mit PBS-T auffüllen		
„Stripping“-Lösung		für 500ml
62,5mM	Tris/HCl, pH6,7	31,3ml [1M]
2%	SDS	100ml [10%]
100mM	β-Mercaptoethanol	3,4ml
mit A. dest. auffüllen.		
RIPA-Puffer		für 1l
0,3M	NaCl	17,5g
20mM	Tris/HCl, pH8	20ml [1M]
1%	Na-Deoxycholat	10g
0,1%	SDS	10ml [10%]
1%	Triton X100	10ml
mit A. dest. auffüllen		
10% Na-Deoxycholat		für 50ml
10%	Na-Deoxycholat	5g
1%	SDS	5ml [10%]
mit A. dest. auffüllen		
0,1% NP40		für 50ml
0,1%	NP40	50µl
1%	SDS	500µl [10%]
mit A. dest. auffüllen		

2.2.5 Puffer und Lösungen für die konfokale Lasermikroskopie

PBS-Glyzin		für 500ml
10mM	Glyzin	0,375g
mit PBS auffüllen		
Blocklösung		für 50ml
10%	Ziegenserum	5ml
mit PBS-Glyzin auffüllen		
3% Paraformaldehyd		für 100ml
3%	Paraformaldehyd	3g
mit 80ml A. dest. auffüllen, Zugabe von 50µl 10N NaOH, erhitzen auf 65°C, mit 10x PBS auffüllen		

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die Amplifikation eines definierten Abschnittes einer DNA-Matrize. Dazu wird die Matrizen DNA zunächst auf 95°C erhitzt, wodurch es zu einer Trennung des komplementären Doppelstranges kommt. In der darauf folgenden Hybridisierungsphase binden speziell hergestellte Oligonukleotide (Primer) an die komplementären Bereiche auf der Matrizen-DNA. Dies geschieht bei einer für das jeweilige Primerpaar definierten Temperatur, um die Bindungsspezifität zu erhöhen. Je höher die Temperatur während der Hybridisierungsphase ist, desto weniger Fehlpaarungen treten auf. In der folgenden Elongationsphase wird der durch die Primer definierte DNA-Abschnitt durch eine thermostabile DNA-Polymerase synthetisiert. Dieser Bereich wird eingegrenzt durch einen in 5'-3' Richtung, und einen revers, in 3'-5' Richtung, auf der Zielsequenz, bindenden Primer. Die zu veranschlagende Dauer des Elongationsschrittes ist abhängig von der Länge des zu synthetisierenden DNA Fragments und von der Synthesegeschwindigkeit der verwendeten DNA-Polymerase. Auf die Elongationsphase folgt ein erneuter Denaturierungsschritt bei 95°C, um die entstandenen doppelsträngigen DNA Fragmente zu trennen. Dieser Zyklus wird typischerweise 25-35 Mal wiederholt, wodurch es zu einer exponentiellen Anreicherung der gewünschten Zielsequenz kommt.

Nachfolgend ist ein typischer Reaktionsansatz beschrieben, wie er für die Amplifikation von DNA Sequenzen in der Molekularbiologie Verwendung findet.

200ng	Matrizen DNA	1µl [200ng]
10pmol	Primer vorwärts	1µl [100pmol]
10pmol	Primer revers	1µl [100pmol]
1x	10x Puffer <i>komplett</i>	5µl
0,2mM	dNTP-Mix	1µl [10mM]
2 Units	Pwo-Polymerase	2µl [1u/µl]
mit A. dest. auf 50µl auffüllen		

Abhängig von der verwendeten DNA Polymerase muß dem Reaktionsansatz noch $MgCl_2$ -Lösung hinzugefügt werden um den Polymerasekomplex zu stabilisieren.

Das Standardprogramm für eine Amplifikation beinhaltet:

Temperatur	Dauer	Zyklenzahl	Zweck
95°C	2min	1	Initiale Denaturierung
95°C	1min	25-35	Denaturierung
ca.55°C	45s	25-35	Primer-Anlagerung
72°C	ca.1min	25-35	DNA Synthese
72°C	10min	1	Endsynthese

Über eine geeignete Veränderung der Basenabfolge innerhalb der Primer ist es beispielsweise möglich in das zu synthetisierende Produkt gezielt Mutationen oder Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme einzufügen um nachfolgende Klonierungen zu erleichtern.

Eine besondere Form der PCR stellt die so genannte „Overlap-PCR“ dar, die eine zielgerichtete Mutation, oder auch Deletion, von DNA Bereichen ermöglicht. Dazu werden Primer verwendet, die in ihrer 5'-Sequenz von der Matrize abweichen, aber dennoch mit ihrer 3'-Sequenz komplementär zur Matrize sind. Der zu mutierende Bereich wird in zwei voneinander unabhängigen Reaktionsansätzen synthetisiert, wobei die Mutation in der einen Reaktion über den vorwärts Primer, und in der anderen über den reversen Primer eingefügt wird. So entstehen zwei DNA Fragmente, die in ihrem mutierten Bereich überlappen. Sie können dann in einer Folgereaktion 1:1 als Matrize eingesetzt werden, wobei die jeweiligen Aussenprimer der ersten Reaktionen verwendet werden. So entsteht ein langes DNA Fragment das im Überlappungsbereich die gewünschte Mutation trägt.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene DNA Polymerasen verwendet. Die Pwo-Polymerase verfügt zwar im Vergleich zur Taq-Polymerase über eine geringere DNA Synthesegeschwindigkeit, hat aber eine 3'-5' Exonukleaseaktivität die es ihr ermöglicht falsch gepaarte Base zu entfernen. Das führt zu einer hohen Sequenzgenauigkeit. Die Taq-Polymerase hingegen besitzt eine hohe DNA Synthesegeschwindigkeit, jedoch keine Korrekturlesefähigkeit. Ein weiterer Vorteil der Taq-Polymerase ist ihre Akzeptanz gegenüber Primern mit langen 5' ungepaarten Enden.

Soweit nicht anders erwähnt, wurde in der vorliegenden Arbeit stets die Pwo-Polymerase, wegen ihrer höheren Genauigkeit verwendet.

2.3.2 Restriktionsverdau von DNA

Unter einem Restriktionsverdau versteht man das Spalten von DNA an definierten Sequenzbereichen. Dazu werden prokaryotische Restriktionsendonukleasen des Typs II verwendet, die doppelsträngige DNA unter Erkennung einer spezifischen Zielsequenz spalten. Diese Zielsequenzen sind meist palindromischer Natur und haben typischerweise eine Länge von 4-6 Basenpaaren. Die DNA wird meist in der palindromischen Sequenz geschnitten, die Spaltstelle kann aber auch um einige Basenpaare strangauf- oder

strangabwärts versetzt liegen. Beim Schneiden des DNA Doppelstrangs können zwei Typen von Enden entstehen. Unter klebrigen („sticky“) Enden versteht man nach dem Schneiden entstandene 5' oder 3' Überhänge, wohingegen bei einem glatten („blunt“) Ende kein Überhang entsteht.

Restriktionsverdau werden analytisch zur Überprüfung von entstehenden Bandenmustern, oder für präparative Zwecke zur weiteren Verarbeitung in Klonierungen verwendet.

Für eine optimale Aktivität der Enzyme müssen geeignete Reaktionspuffer verwendet werden. Diese werden nach den Angaben des Herstellers entsprechend ausgewählt.

Um eine geeignete Menge an Restriktionsenzymen für eine Reaktion einzusetzen wird die benötigte Konzentration über den Unit-Begriff ermittelt. Dieser besagt, daß ein Unit eines gegebenen Enzyms 1µg Substrat DNA unter optimalen Bedingungen in einer Stunde komplett schneidet. Die Restriktionsverdau wurden in dieser Arbeit, soweit nicht anders erwähnt, für 1,5h bei 37°C durchgeführt.

Ein für diese Arbeit typischer Ansatz:

Komponente	analytisch	präparativ
DNA	0,5-1µg	5µg
10x Reaktionspuffer	1,5µl	4µl
Restriktionsenzym	0,5-1u	5-10u
A. dest.	ad. 15µl	ad. 40µl

2.3.3 Dephosphorylierung von DNA Fragmenten

Um nach einem Restriktionsverdau eine Religation größerer DNA Fragmente in einer Ligationreaktion zu verhindern, werden die endständigen 5'-Phosphatreste mittels der alkalischen Kälberdarmphosphatase (CIAP, calf intestine alkaline phosphatase) abgedaut. 10u der Phosphatase wurden den entsprechenden Restriktionsverdauansätzen zugegeben und für 1h bei 37°C inkubiert. Dieses Enzym besitzt in allen verwendeten Restriktionspuffern eine optimale Aktivität, weshalb kein Wechsel des Puffersystems vorgenommen werden musste.

2.3.4 Agarosegelelektrophorese

Lineare DNA Fragmente können in einer Agarosematrix durch Anlegen eines elektrischen Feldes ihrer Länge nach aufgetrennt werden. Aufgrund ihrer negativen Ladungen wandern sie in einem elektrischen Feld in Richtung Kathode. Der Auftrennungsbereich eines Agarosegels liegt zwischen 100 und 10000 Basenpaaren und ist abhängig von der Porengröße innerhalb der Agarosematrix. Diese wiederum wird bestimmt durch die Menge an Agarose in einem gegebenen Volumen.

In dieser Arbeit wurden Agaroselösungskonzentrationen zwischen 0,6 und 2 Gewichts-% eingesetzt. Dazu wird die Agarose entsprechend des Volumens eingewogen, mit TAE aufgekocht und bis etwa 60°C abgekühlt. Direkt vor dem Gießen der Agaroselösung, in eine vorbereitete Gelkammer, werden 4µl noch Ethidiumbromid auf 100ml Agaroselösung zugegeben. Nach dem Aushärten des Gels können die mit 10x DNA Probenpuffer versetzten

Proben in die Geltaschen geladen werden. Die mit TAE gefüllte Kammer wird mit einer Spannung von 30-120V betrieben.

Nach dem Lauf kann die DNA, die in Richtung Kathode gewandert ist, unter UV-Bestrahlung wegen des interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden. Die Größe der sichtbaren Fragmente ist anhand des mitgeführten DNA Größenstandards gut abschätzbar.

Bei einem präparativen Gel wird eine UV-Handlampe geringerer Strahlungsintensität benutzt um Schäden in der DNA durch direkte UV-Einstrahlung möglichst zu verhindern.

2.3.5 Isolation von DNA Fragmenten aus Agarosegelen

Bei einer präparativen Anwendung der Gelelektrophorese werden die DNA Fragmente aus der Agarose eluiert. Dazu werden die unter UV-Licht identifizierten Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt.

Anschließend werden sie mit dem kommerziell erhältlichen Geneclean Turbo Kit den Angaben des Herstellers entsprechend aufgereinigt. Die gewonnenen Fragmente werden in A. dest. aufgenommen.

2.3.6 Ligation von DNA Fragmenten

Lineare DNA Fragmente mit zueinander komplementären Enden werden durch die T4-DNA-Ligase miteinander verknüpft. Diese baut ATP-abhängig Phosphodiesterbindungen zwischen dem 3'-Hydroxyende des einen und dem 5'-Phosphatende des anderen Fragments auf.

Das molare Verhältnis zwischen Vektor und Insert sollte mindestens 1:3 betragen.

Komponente	Menge
Gesamt DNA	4-17µl
10x Ligase Puffer	2µl
T4-DNA-Ligase	1µl
A.dest.	ad. 20µl

Die Reaktion erfolgt für 3h bei RT, oder bei 14°C über Nacht.

2.3.7 Transformation von DNA in kompetente *E.coli* Bakterien

Unter Transformation versteht man das Einbringen von DNA in kompetente Bakterien. Dies kann z.B. über Hitzeschock oder Elektroporation geschehen. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich die Transformation über den Hitzeschock angewandt. Bei dieser Methode bringt man Plasmid-DNA in Bakterien ein. Diese wird dort, durch die Vermehrung der Bakterien, vermehrt. Danach kann man sie in großen Mengen wieder isolieren. Die *E.coli* Bakterien werden chemisch durch die Behandlung mit CaCl₂ und RbCl₂ kompetent gemacht und danach bei -80°C eingefroren.

Zur Transformation werden die Bakterien langsam auf Eis aufgetaut.

2.3.7.1 „Standard-Transformation“

Für die Transformation werden 100µl der auf Eis aufgetauten Bakterien mit 10µl des Ligationsansatzes (Kap. 2.3.6) vorsichtig versetzt und 30min auf Eis inkubiert. Danach folgt für 1min der Hitzeschock bei 42°C und ein erneutes Kühlen auf Eis für 3min. Anschließend wird der Ansatz mit 500µl SOC-Medium aufgefüllt und für ca. 60min bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend werden die Bakterien bei 3500rpm für 3min sedimentiert. 500µl des Überstandes werden abgenommen und verworfen. Die Bakterien werden in den restlichen 100µl resuspendiert und auf einer vorgewärmten Agar-Platte, mit dem entsprechenden Selektionsmarker, ausgestrichen und über Nacht in einem 37° Ofen inkubiert.

Für die Transformation von Ligationsansätzen mit vergleichsweise wenig Plasmid DNA werden DH5α-Bakterien verwendet, da sie hoch kompetent sind, d.h. sehr gut DNA aufnehmen.

2.3.7.2 „Quick-Transformation“

Für die Transformation von bereits vorhandener Plasmid DNA, d.h. DNA in hohen Konzentrationen, kann die Methode der „Quick-Transformation“ angewandt werden. Hierbei werden 50µl JM109 Bakterien mit 1-5µl Plasmid DNA vermischt und für 5min auf Eis gestellt. Danach wird dieser Ansatz direkt auf eine Agar-Platte mit dem entsprechenden Selektions-Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.3.8 Plasmidextraktion aus Bakterien mittels alkalischer Lyse

Die Anzucht der Bakterien erfolgt über Nacht auf einem Schüttler bei 37°C in LB Medium, welches mit dem entsprechenden Selektions-Antibiotikum versetzt worden ist.

2.3.8.1 Mini-Präparation

Für eine Aufbereitung kleiner Übernachtskulturen zu analytischen Zwecken wird die Mini-Präparation von Plasmiden aus *E.coli* durchgeführt (verändert nach Birnboim und Doly, 1979).

Dazu werden je 2ml LB Medium mit jeweils einer *E.coli* Einzelkolonie beimpft und über Nacht inkubiert. Die Bakteriensuspension wird dann in ein Eppendorf-Gefäß überführt und für 5min bei 7000rpm sedimentiert. Der Überstand wird abgenommen und verworfen. Das verbliebene Bakterienpellet wird in 100µl kalter Plasmidpräparationslösung I (Kap. 2.2.3) resuspendiert und mit 10µl RNaseA-Lösung versetzt. Der Ansatz wird für 5min auf Eis gesetzt. Danach werden 100µl Plasmidpräparationslösung II zugegeben und der Ansatz vorsichtig durch invertieren des Gefäßes gemischt. Es wird erneut für 5min auf Eis inkubiert. Anschließend werden 200µl kalte Plasmidpräparationslösung III zugefügt, durch invertieren gemischt, und wiederum für 5min auf Eis inkubiert. Darauf folgend wird das Eppendorf-Gefäß für 15min bei 14000rpm zentrifugiert und 350µl des Überstandes in ein neues Gefäß überführt. Der Überstand wird mit 220µl Isopropanol gemischt und erneut zentrifugiert. Durch das Zentrifugieren wird die Plasmid DNA gefällt und das Pellet anschließend mit 70% Ethanol gewaschen. Nach 15min Zentrifugation bei 14000rpm wird der Überstand abgesaugt, die DNA getrocknet, und in 50µl TE-Puffer aufgenommen.

2.3.8.2 Midi-Präparation

Um Plasmid DNA in größerer Menge und mit einem hohen Reinheitsgrad zu gewinnen wird eine Midi-Präparation durchgeführt. Die hierbei gewonnene Plasmid DNA wird für weitergehende Anwendungen wie Transfektionen oder Klonierungen verwendet.

Es werden 100ml LB Medium, versetzt mit dem entsprechenden Selektions-Antibiotikum, angeimpft und über Nacht bei 37°C und Schütteln inkubiert. Die Suspension wird am darauf folgenden Tag für 5min bei 7000rpm sedimentiert. Das entstandene Bakterienpellet wird in 5ml kalter Plasmidpräparationslösung I resuspendiert, mit 150µl RNaseA-Lösung versetzt und für 5min auf Eis gestellt. Es werden 5ml Plasmidpräparationslösung II zugegeben, der Ansatz wird vorsichtig durch invertieren gemischt und erneut für 5min auf Eis inkubiert. Danach werden 10ml kalte Plasmidpräparationslösung III zugegeben, gemischt und auf Eis gestellt. Nach 5min wird der Ansatz für 15min bei 17000rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der Überstand durch eine mit Mull gestopfte Pipettenspitze pipettiert, um restliche Zelltrümmer abzutrennen, und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Zu der so gereinigten Lösung werden 12ml Isopropanol gegeben und der Ansatz durch Schütteln gemischt. Die enthaltene DNA wird durch einen weiteren Zentrifugationsschritt pelletiert, mit 70% Ethanol gewaschen und erneut für 15min bei 17000rpm zentrifugiert. Die gut sichtbaren DNA Pellets werden getrocknet und in 1ml A. dest. aufgenommen. Es werden zusätzlich 25µl RNaseA-Lösung zugefügt und die Lösung für 1h bei 37°C inkubiert.

2.3.9 Phenol-Chloroform Extraktion von Plasmid DNA

Zur Aufreinigung von DNA aus wässrigen Lösungen, vor allem nach einer Midi-Präparation, erfolgt eine Phenol-Chloroform Extraktion. Dabei wird die Tatsache ausgenutzt, dass nach Vermischen einer wässrigen Lösung mit Phenol, einer organischen Lösung, Proteine sich in der organischen Phase und der Interphase anreichern. Die DNA hingegen verbleibt in der oberen, wässrigen Phase.

Die wässrige Plasmid-Lösung wird 1:1 mit Phenol versetzt und gemischt. Nach 3min Zentrifugation bei 14000rpm wird die obere, wässrige Phase abgenommen und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Diese wird erneut 1:1 mit einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) vermennt, gemischt und für 3min bei 14000rpm zentrifugiert. Nach dem Überführen der oberen Phase in ein neues Eppendorf-Gefäß wird Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) hinzugefügt, gemischt und zentrifugiert. Nach dem Überführen der wässrigen Phase in ein neues Gefäß werden, um die DNA zu fällen, 0,1 Volumen Na-Azetat und 0,6 Volumen Isopropanol zugesetzt. Dieser Ansatz wird geschwänkt und für 15min bei 14000rpm zentrifugiert. Die gefällte DNA wird mit 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach der letzten Zentrifugation wird die DNA getrocknet und in 200µl TE-Puffer aufgenommen.

2.3.10 Spektrometrische Bestimmung der DNA Konzentration

Um das Arbeiten mit gewonnener Plasmid DNA standardisieren zu können wird die Konzentration in einem gegebenen Volumen bestimmt. Dazu nutzt man die Eigenschaft von Nukleinsäuren aus, ultraviolettes Licht mit einem Maximum bei 257nm zu absorbieren. Die Nukleinsäurekonzentration [µg/ml] errechnet sich daher aus dem Ergebnis der OD₂₆₀-

Messung, dem Verdünnungs- und einem Multiplikationsfaktor, der für dsDNA (50), ssDNA (37) und RNA (40) jeweils spezifisch ist.

Um eine Aussage über die Reinheit des Gemisches treffen zu können, wird zusätzlich noch die Extinktion bei einer Wellenlänge von 280nm gemessen. Bei dieser Wellenlänge haben Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten ihr Absorptionsmaximum. So lassen sich aus dem Koeffizienten der OD₂₆₀ und OD₂₈₀ Messung Rückschlüsse über den Verunreinigungsgrad mit Proteinen und RNA treffen.

Ein OD_{260/280}-Wert zwischen 1,8 und 2 lässt auf eine relativ saubere, proteinarme Lösung schließen. Liegt der Wert unter 1,8 lässt dies auf Verunreinigungen durch Proteine oder Phenol schließen. In diesem Fall ist eine erneute Fällung und Extraktion der DNA, gemäß den Kapiteln 2.3.8 und 2.3.9 ratsam.

Die Messung aufgereinigter Plasmidlösungen erfolgt mit einer 1:200 Verdünnung der DNA in TE-Puffer in Quarzküvetten in einem Biophotometer der Firma Eppendorf.

2.3.11 DNA Sequenzierung

Die Überprüfung neu hergestellter klonierter Plasmide auf richtige Basenabfolge erfolgt durch DNA Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977). Das „ABI Prism Big Dye Kit“ enthält alle für diese Reaktion notwendigen Komponenten, mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte ddNTPs, Puffer und DNA Polymerase. Die fragmentierten, in der Sequenzier-PCR hergestellten DNA Stücke werden dann automatisch in einem Platten- oder Kapillarsequenzierer von Becton Dickinson erkannt.

Nachfolgend der für diese Arbeit angewandte Reaktionsansatz:

Komponente	Menge
Plasmid DNA	0,5µl
Primer [10pmol]	1µl
Big Dye Mix	2µl
A. dest.	6,5µl

Der Ansatz wurde wie folgt amplifiziert:

Temperatur	Dauer	Zyklen	Zweck
95°C	2min	1	Initiale Denaturierung
95°C	10s	25	Denaturierung
50°C	5s	25	Primer-Anlagerung
60°C	4min	25	DNA Synthese

Anschließend werden die Reaktionsansätze mit Hilfe der „Multi Screen 96-well Filtration Plate“ gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt, um nicht eingebaute, fluoreszenzmarkierte ddNTPs zu entfernen. Die in Eppendorf-Gefäße überführten Ansätze werden in der Speed-Vac Zentrifuge getrocknet und anschließend ihrer Größe nach aufgetrennt und sequenziert.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden mit D-MEM komplett (Kap.2.2.2) kultiviert. Die Haltung erfolgte in unterschiedlichen Zellkulturflaschen, abhängig von der Zelllinie (293T in 125cm²-, HT1080 in 75cm²-Flaschen), in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Da sowohl 293T als auch HT1080 Zellen adhärent unter Ausbildung eines einheitlichen Zellrasens (Monolayer) wachsen, müssen sie bei einer 80-100%igen Konfluenz vereinzelt (Splitten) und in neue Flaschen eingesäht werden. Dazu wird mit einer sterilen Pipette das verbrauchte Medium abgenommen und der Zellrasen mit 5ml sterilem PBS gewaschen. Nach Abnahme der PBS Lösung werden 3-5ml Trypsin-EDTA Lösung in die Zellkulturflasche gegeben und diese in den Brutschrank überführt. Nach etwa 5min wird die Trypsin Reaktion durch Zugabe von 5ml D-MEM komplett abgestoppt und die Zellen resuspendiert. Für eine weitere Kultivierung der Zellen werden diese in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:20 in neue Flaschen eingesäht und mit D-MEM komplett versetzt. Die weitere Kultivierung geschieht wieder in einem Brutschrank.

Für Transfektionsexperimente müssen Zellen in bestimmter Anzahl in kleinere Schalen oder Platten ausgebracht werden. Dazu werden sie trypsinisiert und anschließend die Zellzahl pro ml in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Durch Zugabe von Trypan-Blau können tote Zellen identifiziert werden, da der Farbstoff von lebenden Zellen nicht aufgenommen wird und diese im Mikroskop hell erscheinen. Die durch das Auszählen eines großen Quadrates ermittelte Zellzahl wird dann mit dem Verdünnungsfaktor und mit 10⁴ multipliziert um auf die Zellkonzentration/ml zu kommen. Dem Experiment entsprechend werden dann die Zellen mit D-MEM verdünnt und in die jeweiligen Schalen oder Platten ausgesäht.

2.4.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wird eine konfluente Flasche einmal mit PBS gewaschen und danach die Zellen mit Trypsin-EDTA abgelöst. Nach dem Abstoppen der Trypsin Reaktion mit D-MEM komplett werden die resuspendierten Zellen in ein steriles 15ml Falconröhrchen überführt und 5min bei 1200rpm in einer Zellzentrifuge pelletiert. Das Medium wird abgesaugt und zügig durch die erforderliche Menge an Einfriermedium ersetzt. Die Zellen werden rasch resuspendiert und in 1ml Aliquots in Cryo-Röhrchen aufgeteilt. Für eine Lagerung über kürzere Zeiträume werden die Zellen in einen -80°C Gefrierschrank aufbewahrt, für längere Zeiträume in flüssigem Stickstoff.

2.4.3 Transfektion

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Dies kann auf verschiedene Weisen durchgeführt werden. Gelangt die DNA in den Zellkern der Zielzelle, werden dort die auf den Nukleinsäuren kodierten Gene durch den zellulären Transkriptionsapparat abgelesen. Damit dies jedoch geschieht, müssen auf der Plasmid DNA entsprechende cis-aktive Sequenzen, wie z.B. Promotoren, vorhanden sein. Bei einer Transfektion handelt sich aber um eine transiente Genexpression, da die Plasmide bei einer

Zellteilung nicht repliziert, und nur ungleichmäßig an Tochterzellen weitergegeben werden. Dadurch nimmt die Expression eines Transgens mit der Zeit ab. Durch die Verwendung der Zelllinie 293T kann dieser Effekt zumindest teilweise umgangen werden, da die Zellen stabil das große SV40 T-Antigen exprimieren. Durch Bindung an den SV40 Replikationsursprung (ori) (z.B. plasmidkodiert) kommt es über eine Interaktion mit der zellulären Replikationsmaschinerie zu einer Vervielfältigung des Plasmids. Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide tragen einen SV40 ori.

In dieser Arbeit kamen drei verschiedene Transfektionsmethoden zum Einsatz.

2.4.3.1 CaPO₄-Transfektion

Die CaPO₄-Transfektion ist eine effiziente Methode für eine Vielzahl von Zelllinien. Jedoch ist das Transfektionsgemisch relativ toxisch für die Zellen und es muß, im Vergleich zu anderen Methoden, viel Plasmid DNA eingesetzt werden. Der genaue Mechanismus der DNA-Aufnahme ist nicht bekannt. Man geht jedoch davon aus, dass DNA und CaPO₄ feine Kristallstrukturen bilden, die dann auf die Zellen niedersinken und über Endozytose aufgenommen werden. Wie dieser Komplex aber aus den endozytotischen Vesikeln in den Zellkern gelangt ist unklar.

Einen Tag vor der Transfektion werden 2×10^6 293T Zellen in 6cm Schalen in 4ml D-MEM komplett ausgesäht.

Das Transfektionsgemisch wird wie folgt hergestellt:

Komponente	Menge
DNA	15µg
CaCl ₂	62µl
A. dest.	423µl

Zu diesem Gemisch werden 500µl 2x HBS unter Blasenbildung pipettiert und die Lösung auf die Zellen getropft.

Das Medium mit dem Transfektionsmix wird 7-9h nach der Transfektion durch frisches D-MEM komplett ersetzt.

2.4.3.2 Polythylenimin- (PEI) Transfektion

Die PEI-Transfektion ist eine kostengünstige und sehr effiziente Art der Transfektion. Sie ist weniger toxisch als die CaPO₄-Transfektion und kann daher auch auf empfindlicheren Zelllinien Verwendung finden. Es wird darüber hinaus auch weniger DNA benötigt und die Transfektionseffizienz ist ebenfalls höher.

PEI ist ein kationisches Polymer, das mit negativ geladener DNA stabile Komplexe eingeht. Es wird von den Zielzellen vermutlich über Endozytose aufgenommen. Die Freisetzung der DNA aus den Endosomen geschieht wahrscheinlich aufgrund des Protonenschwamm-Effekts dieses Komplexes (Bieber et al., 2002), welcher eine Änderung des pH-Wertes der Endosomen sowie einen erhöhten osmotischen Druck bewirkt. Das führt zum Platzen der Endosomen und zur Freisetzung der transfizierten DNA.

Diese Methode wurde in der vorliegenden Arbeit meist zur Herstellung virushaltiger Zellkulturüberstände verwendet. Daher bezieht sich das folgende Protokoll auf 10cm Zellkulturschalen.

Einen Tag vor der Transfektion werden 6×10^6 293T Zellen in 10ml D-MEM komplett ausgesäht. Direkt vor der Transfektion wird das Medium durch D-MEM mit 15% FCS ersetzt.

Lösung 1:

Komponente	Menge
PEI-Lösung	45µl
D-MEM ohne Zusätze	955µl

Lösung 2:

Komponente	Menge
DNA [1µg/µl]	15µg
D-MEM ohne Zusätze	985

Beide Lösungen werden für 15-30min bei RT inkubiert

Danach werden beide Lösungen vereint und auf die Zellen getropft. Das Transfektionsgemisch muß nicht wieder von den Zellen entfernt werden.

2.4.3.3 FugeneHD-Transfektion

Für die Transfektion von HT1080 Zellen eignet sich vor allem das FugeneHD-Reagenz, da Erfahrungen in unserem Labor gezeigt haben, dass andere Methoden zu toxisch sind und zum Ablösen und Absterben der Zellen führen.

FugeneHD ist ein lipidhaltiges Reagenz, welches mit der Plasmid DNA interagiert. Es wird von Zielzellen über einen nicht-liposomalen Weg aufgenommen, der genaue Aufnahmenmechanismus jedoch ist ungeklärt.

In dieser Arbeit wurden nur HT1080 für die konfokale Lasermikroskopie mit FugeneHD transfiziert. Die Mengenangaben beziehen sich aus diesem Grund auf Transfektionen in 12-well Platten.

Einen Tag vor der Transfektion werden 3×10^4 HT1080 Zellen in 12-well Platten in je 1ml D-MEM komplett ausgesäht.

Der Transfektionsansatz sieht wie folgt aus:

Komponente	Menge
D-MEM ohne Zusätze	92µl
FugeneHD	6µl

Es ist darauf zu achten, dass das FugeneHD Reagenz nicht direkt mit der Wand des Eppendorf-Gefäßes in Berührung kommt, da es ansonsten dort adheriert. Der Ansatz wird durch vorsichtiges Klopfen am Gefäß gemischt.

Zu diesem Ansatz werden 2µl DNA [1µg/µl] gegeben und der Ansatz erneut gemischt. Nach 20min Inkubation bei RT wird das Transfektionsgemisch auf die Zellen getropft. Das Medium wird nach der Transfektion nicht mehr gewechselt.

2.4.4 Na-Butyrat Induktion

Ein CMV Promotor ist ein konstitutiv aktiver Promotor, dessen Aktivität jedoch durch die Zugabe von Na-Butyrat noch verstärkt werden kann (Soneoka et al., 1995). Alle in dieser Arbeit benutzten und hergestellten Plasmide tragen als cis-aktives Element einen CMV Promotor, der die Genexpression antreibt. Die Induktion erfolgt 24h nach Transfektion durch Zugabe von Na-Butyrat in einer Konzentration von 10mM. Wegen der relativ hohen Toxizität von Na-Butyrat wird das Medium 6-8h nach Induktion durch frisches ersetzt. Transfizierte HT1080 Zellen werden nicht mit Na-Butyrat induziert.

2.4.5 Milde Lyse eukaryotischer Zellen

Für eine Analyse intrazellulärer Proteine im SDS-PAGE nach einer Transfektion werden die Zellen mit dem Lysepuffer II lysiert. Hierbei kommt es durch den Einsatz von Triton X100 zur Permeabilisierung der Plasmamembran. Die zellulären Proteine werden durch die Verwendung von β -Mercaptoethanol, durch eine Reduktion vorhandener Schwefelbrücken, denaturiert. Bei dieser Methode wird zwar die Plasmamembran zerstört, die Kernmembran jedoch bleibt intakt.

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode nur für 6- bzw. 10cm Schalen angewandt, daher beziehen sich auch die Mengenangaben darauf.

Die Zellen in den Transfektionsschalen werden einmal mit PBS gewaschen und dann mit 600 μ l des Lysepuffers II für mindestens 10 min bei 4°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit einem Zellschaber von der Schalenoberfläche abgelöst, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und durch vortexen gut gemischt. Die Zelltrümmer und Zellkerne werden durch eine anschließende Zentrifugation für 3min bei 14000rpm abgetrennt. Der Überstand wird in ein neues Gefäß überführt und mit dem gleichen Volumen 2xPPPC versetzt, gemischt und für 5min bei 95°C gekocht. Danach können die Proben direkt für eine SDS-PAGE verwendet oder bei -20°C eingefroren werden.

Alternativ hierzu kann zu einer besseren Homogenisierung der Zelllysate das kommerziell erhältliche QIAshredder™-System von Qiagen verwendet werden. Hierbei werden die Zellen ebenfalls mit je 600 μ l Lysepuffer II lysiert und abgeschabt. Das die Zelltrümmer enthaltende Gemisch wird direkt auf eine QIAshredder™-Säule gegeben und für 1min bei 14000rpm zentrifugiert. Der Durchfluß wird in ein neues Eppendorf-Gefäß transferiert und die Säule mit dem gleichen Volumen (600 μ l) 2xPPPC beladen. Diese wird dann erneut für 1min bei 14000rpm zentrifugiert. Die beiden Durchflüsse werden vereinigt und für mindestens 5min bei 95°C gekocht. Die Proben können dann direkt weiterverarbeitet oder bei -20°C eingefroren werden.

2.4.6 Durchflußzytometrie (FACS-Analyse)

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS) können Zellpopulationen hinsichtlich ihrer physikalischen Eigenschaften charakterisiert werden. Dazu werden die Zellen vereinzelt und in einem laminaren Flüssigkeitsstrom an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Anhand der Ablenkung des

Laserstrahlen können Rückschlüsse über die Größe und die Granularität der Zellen gezogen werden. Dies dient zur Identifizierung verschiedener Zellpopulationen, und der Unterscheidung zwischen toten Zellen, Zelltrümmern und lebenden Zellen. Darüber hinaus lässt sich die Expression eines Markergens direkt oder indirekt nachweisen. Im Falle von eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) als Markergen wird das Fluorochrom direkt durch die Anregung des Lasers detektiert.

In dieser Arbeit wurde stets die Expression von eGFP als Reportergen in einer Zellpopulation mit Hilfe eines FACS-Calibur Gerätes (Becton Dickinson) und der Cell-Quest Software (Becton Dickinson) quantitativ bestimmt.

Dazu werden die Zellen in 12-well Platten einmal mit PBS gewaschen und für 5-10min mit 0,5ml Trypsin-EDTA bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird mit 1,5ml D-MEM komplett abgestoppt und die Zellen in resuspendierter Form in vorbereitete FACS-Röhrchen transferiert. Die Zellen werden in einer Zellzentrifuge für 5min bei 1200rpm pelletiert. Anschließend wird der Überstand durch schwungvolles Auskippen des Röhrchens entfernt und durch 300µl PBS ersetzt. Die Zellen werden auf Eis gestellt und sofort der FACS-Analyse unterzogen.

2.4.7 Histochemische β -Galactosidase Färbung

Eine histochemische β -Galactosidase Färbung dient dem Nachweis der zellulären Expression des β -Galactosidase Reportergens. Hierbei wird das in der Färbelösung enthaltene Substrat X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-Indoxyl- β -D-Galactosid) von der β -Galactosidase in einen nicht löslichen blauen Farbstoff umgesetzt.

Dazu werden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit der lacZ-Fixierlösung (Kap.1.2.2) für 10min bei 4°C fixiert. Anschließend werden die Zellen 2-3mal mit PBS gewaschen um eventuelle Rückstände der Fixierlösung zu entfernen. Darauf folgend werden die Zellen mit 500µl Färbelösung für 3-6h bei 37°C inkubiert. Der Färbeprozess ist je nach Intensität der Blaufärbung abubrechen. Die Färbelösung wird danach abgezogen und durch 50% Glyzerol in A. dest. ersetzt. Die Anzahl blau gefärbter Zellen kann nun unter einem Mikroskop ermittelt werden.

2.5 Virologische Methoden

2.5.1 Das retrovirale Vektorsystem

In dieser Arbeit wurden bei Infektionen ausschließlich replikationsdefiziente Virusvektoren benutzt die nicht in der Lage sind sich in den infizierten Zielzellen nach einer Integration zu vermehren.

Die verwendeten Vektoren kodieren für die viralen Gene gag und pol und tragen alle cis-aktiven Elemente, die für eine Verpackung der viralen RNA in ein Viruspartikel sowie die Reverse Transkription und Integration in eine Zielzelle notwendig sind. Das env-Gen ist auf diesen Vektoren deletiert. Anstelle des Hüllproteins kodieren diese Vektoren für das Markergen eGFP unter der Kontrolle eines SFFV U3 Promotors. Zusätzlich sind alle akzessorischen Gene deletiert, sowie eine Sequenz in der U3-Region. Da das virale Hüllprotein Env auf den Vektoren nicht kodiert wird, muß es für die Produktion von

Viruspartikeln auf einem separaten Expressionsplasmid in die virusproduzierenden Zellen kotransfiziert werden. Nach einer Infektion wird die Vektor-DNA stabil in das Zielzellgenom integriert. Das Fehlen des viralen Transaktivators Tas, sowie der Promotor- und Enhancersequenzen in der U3-Region führen dazu, dass in der Zielzelle der virale Promotor inaktiviert, ohne transkriptionelle Aktivität, vorliegt. Die Expression des Markergens hingegen, wird von dem separaten SFFV U3 Promotor angetrieben. Durch die Deletion des env-Gens auf dem Vektor liegt in der infizierten Zelle kein virales Hüllprotein mehr vor. Durch den inaktiven viralen Promotor, sowie das Fehlen des Hüllproteins und des Transaktivators Tas kommt es in der Zielzelle nicht zur Bildung von Nachkommenviren.

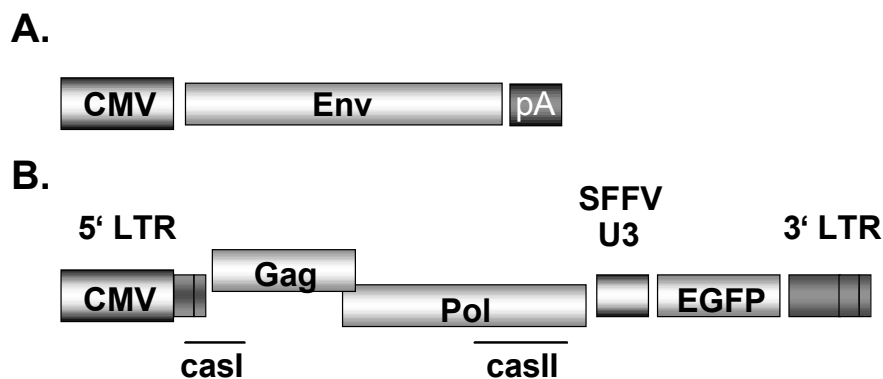


Abbildung 9: Replikationsdefizientes Vektorsystem

(A) Schematische Darstellung eines Env-Expressionsplasmids. (B) Schematische Darstellung eines foamyviralen Vektorkonstruktes zur Herstellung von Gag und Pol, sowie einer verpackbaren RNA. CMV: Promotor/Enhancer des humanen Cytomegalie Virus (CMV); LTR: „Long Terminal Repeat“ –Region; SFFV U3: LTR Promotor des Spleen Focus Forming Virus; pA: PolyA-Sequenz des bovinen Wachstumshormons; casI/II: „cis acting sequence“ I/II

2.5.2 Herstellung zellfreier viraler Überstände

Je nach Anwendung wurden in dieser Arbeit 293T Zellen in 6- oder in 10cm Schalen nach der PEI-Transfektionsmethode (Kap. 2.4.3.2) transfiziert.

Die virushaltigen Überstände werden 48h nach der Transfektion abgenommen, durch einen kurzen Zentrifugationsschritt, 5min bei 1200rpm, durch die Sedimentation von Zelltrümmern vorgeklärt und anschließend steril durch einen 0,45µm Porenfilter (0,45µm Filter: FP 30/0,45 CA-S; Schleicher & Schüll) filtriert. Die so gewonnenen Virussuspensionen können sofort weiterverwendet oder für eine spätere Verwendung bei –80°C eingefroren werden.

2.5.3 Die „Freeze-and-Thaw“-Methode

Da Foamyviren über zelluläre Membranen auch in intrazelluläre Kompartimente knospen, wird bei einer Analyse der infektiösen Partikel auch die Menge der intrazellulär verbliebenen Partikel bestimmt.

Dazu werden nach dem Absaugen des Überstandes die Zellen mit dem gleichen Volumen D-MEM komplett erneut überschichtet und auf Trockeneis oder in einen –80°C Kühlschrank überführt. Dort verbleiben sie, bis das Medium komplett gefroren ist, was an einer

homogenen Gelbfärbung zu erkennen ist. Dies führt zum Platzen der transfizierten Zellen und somit zur Freisetzung der intrazellulären Viruspartikel in den Überstand. Anschließend werden die Zellkulturschalen in einen 37°C Brutschrank gestellt bis das Medium wieder komplett aufgetaut ist. Danach wird es mittels einer sterilen Pipette in ein 15ml Falconröhrchen transferiert, vorgeklärt und 0,45µm filtriert. Auch hier können die Virussuspensionen sofort weiter verarbeitet oder für eine längere Zeit bei –80°C eingefroren werden.

2.5.4 Infektion eukaryotischer Zellen

In dieser Arbeit wurden stets HT1080 Zellen infiziert, die dann durchflußzytometrisch oder durch histologische β -Galactosidasefärbung auf einen Markergentransfer hin analysiert wurden.

Die Zielzellen für eine Infektion werden einen Tag vorher in einer Konzentration von $1,5 \times 10^4$ in je 1ml D-MEM komplett in 12-well Platten ausgesäht. Von transfizierten Zellen werden virale Überstände gemäß dem Kapitel 2.5.2 gewonnen und diese unverdünnt, oder in geeigneten Verdünnungsstufen, auf die ausgesähten HT1080 Zellen getropft. Die Zellen werden dann für 6-8h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Danach wird die Infektion beendet indem das Medium durch frisches D-MEM komplett ersetzt wird. Die Analyse des Markergentransfers, und somit die Infektionseffizienz, erfolgt nach 48h (Kap. 2.4.6).

2.5.5 Temperatursensitivitätstest

Durch Mutationen im Erbmateriale von Viren können phänotypische Unterschiede im Replikationszyklus auftreten. Eine Methode solche Virusmutanten zu untersuchen ist der Test auf Temperatursensitivität. Damit ist gemeint dass bestimmte Abschnitte des viralen Replikationszyklus und der Infektion bei einer von der physiologischen Temperatur abweichenden untersucht werden. Dabei können phänotypische Abweichungen der Mutanten vom Wildtyp verstärkt, oder teilweise aufgehoben werden.

Bei diesen Versuchen werden 293T Zellen mittels der CaPO_4 -Methode transfiziert (Kap. 2.4.3.1). Nach 24h werden die Zellen für die Zeit der Na-Butyrat Induktion (Kap. 2.4.4) in einen Brutschrank gestellt, der statt der üblichen 37°C eine Temperatur von nur 30°C bei 5% CO_2 hat. Nach der Beendigung der Induktion verbleiben die Zellen über Nacht bei 30°C. Für die Infektion werden, wie in Kap.2.5.4 beschrieben, HT1080 Zellen ausgesäht. Die Infektion erfolgt 24h nach der Induktion ebenfalls bei 30°C. Nach 6-8h wird die Infektion beendet, das Medium auf den Zielzellen durch frisches ersetzt und die Zellen auf 37°C umgesetzt.

Die Analyse der Infektion erfolgt wie in Kap.2.4.6 beschrieben 48h nach der Infektion.

2.5.6 Viruspartikelpräparation

Um virale Proteine proteinbiochemisch analysieren zu können müssen diese zum einen aufkonzentriert, zum anderen von Zelltrümmern gereinigt werden. Dazu wird das Prinzip der Dichtezentrifugation angewendet. Viruspartikel haben eine höhere Dichte als beispielsweise lösliche zelluläre Proteine oder Membranbestandteile. Durch die Wahl eines

Separationsmediums mit entsprechender Dichte können die Viruspartikel mittels eines Zentrifugationsschrittes von den übrigen Zelltrümmern getrennt und aufkonzentriert werden.

Virale Überstände werden von transfizierten Zellen (Kap. 2.4.3.2) abgenommen und vorgeklärt (Kap. 2.5.2). In Röhrchen für Ultrazentrifugationen werden je 2ml einer 20%igen Sucroslösung vorgelegt. Auf dieses Sucrosekissen wird vorsichtig der virushaltige Überstand geschichtet, so dass die Integrität des Kissens gewahrt bleibt. Diese Röhrchen werden anschließend in einem Swing-Out Rotor in einer Ultrazentrifuge (SW40 Rotor in Optima™ LE-80K Ultracentrifuge, Beckman Coulter) für 2,5h bei 25000rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird das Medium aus den Röhrchen bis auf das Sucrosekissen abgesaugt. Das Sucrosekissen wird dann mit einem Schwung ausgegossen und das Röhrchen über Kopf gestellt. An dieser Stelle gilt es zu vermeiden, dass die in dem Röhrchen verbliebene Sucrose zurückläuft und das nicht sichtbare Viruspellet löst. Sucrosereste werden mit einem RNase freiem Papiertuch entfernt, das Viruspellet in 50µl PBS resuspendiert und in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. Um die Virusproteine zu denaturieren wird den 50µl das gleiche Volumen 2xPPPC hinzugefügt und der Ansatz für 5min bei 95°C gekocht. Die Proben können nun weiterverarbeitet oder bei -20°C eingefroren werden.

2.6 Proteinbiochemische Methoden

2.6.1 Trizin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Mit Hilfe der Trizin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (modifiziert nach Schägger und Jagow, 1987) können Proteine ihrer Größe entsprechend aufgetrennt werden. Diese diskontinuierliche denaturierende Elektrophorese hat einen Auftrennungsbereich, abhängig vom Vernetzungsgrad zwischen Acrylamid und Bis-Acrylamid, von 10-220kD. Das Acrylamid polymerisiert durch freie Radikale, die von APS (Ammoniumproxysulfat) abgegeben und durch TEMED (N'-N'-N'-N'-Tetramethylendiamin) stabilisiert werden. Die Acrylamidfasern werden durch polymerisiertes Bis-Acrylamid quervernetzt wobei das Verhältnis die Porengröße bestimmt. Die zu analysierenden Proteine werden durch die Zugabe von β -Mercaptoethanol denaturiert. Darüber hinaus wird die eigentliche Nettoladung der Proteine durch SDS (Natriumlaurylsulfat) maskiert, was zu einer starken negativen Ladung führt, entsprechend der Länge der Proteine. So wird erreicht, dass Proteine sich in einem elektrischen Feld nur entsprechend ihrer Größe und nicht anhand ihrer Eigenladungen auftrennen.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich 7,5% Gele verwendet, die anschließend mit einem 4% Sammelgel überschichtet wurden.

Komponente	7,5% Gel	4% Sammelgel
Acrylamid-Stammlösung (Rotiphorese 30)	7,5ml	1,35ml
Trizin-Gelpuffer	9,9ml	2,5ml
Glyzerol	2,5ml	--
A. dest.	9,3ml	6,15
10% APS	300µl	100µl

TEMED	30µl	10µl
-------	------	------

Die Lösungen werden mit kaltem A. dest. angesetzt um einer vorzeitigen Polymerisation vorzubeugen.

Die Komponenten werden bis auf 10% APS und TEMED zusammengegeben und vorsichtig, unter Vermeidung von Blasenbildung, gemischt. Anschließend werden die beiden letzten Komponenten, APS und TEMED, hinzugefügt und die Lösung nach kurzem Mischen vorsichtig in eine vorbereitete Gelkuvette gegossen. Nach dem Gießen des Gels wird dieses noch mit A. dest. überschichtet, um zu gewährleisten, dass beim Polymerisieren eine glatte Oberfläche entsteht. Wenn das Trenngel vollständig auspolymerisiert ist, wird in die Gelkuvette auf das Trenngel das Sammelgel geschichtet. In dieses wird ein Kamm eingeführt, welcher die für das Beladen notwendigen Geltaschen bereitstellt.

Nach dem Polymerisieren der Gele wird die Elektrophoresekammer vorbereitet. Dazu wird der Boden, der die Anode ist, mit 1l Anodenpuffer (Kap. 2.2.4) aufgefüllt. Das Gel wird in die Kammer gesetzt, und in die Kathodenkammer der Kathodenpuffer eingefüllt. Vor dem Beladen der Taschen werden diese gründlich mit Kathodenpuffer gespült um Gel- und Wasserreste zu entfernen. Die Proteinproben werden nochmal für 5min bei 95°C gekocht, gevortext und gegebenenfalls zentrifugiert. Anschließend werden die Taschen mit 30-100µl der jeweiligen Probe gefüllt. Ein Proteingrößenstandard wird mitgeführt (12µl). Freie Taschen werden mit einem den Proben entsprechendem, Volumen PPC gefüllt.

Der Lauf erfolgt über Nacht bei einer Stromstärke von 20-30mA.

2.6.2 Western Blot

Beim dem Verfahren des Western Blots werden die Proteine, die vorher in einem SDS Gel aufgetrennt wurden auf einen geeigneten Träger, in dieser Arbeit eine Nitrozellulosemembran, transferiert. Dies geschieht in einer Kammer mit Graphitelektroden, wo durch Anlegen einer Spannung die negativ geladenen Proteine aus dem Gel auf die positiv geladene Membran übertragen werden, wo sie dann immobilisiert sind.

Die auf diese Weise fixierten Proteine können dann mittels Immunfärbung spezifisch nachgewiesen werden.

Im „Semi-Dry“ Western Blot Verfahren werden mit Transfer-Puffer (Kap. 2.2.4) getränkte Filterpapiere auf die untere Graphitelektrode, die Kathode, gelegt. Darauf kommt dann die geschnittene Nitrozellulosemembran, gefolgt von dem Proteingel. Dieses sollte zügig, ohne weiteres verrutschen aufgelegt werden, um Verunreinigungen auf der Membran auszuschließen. Auf das Gel wird eine weitere Schicht getränkter Filterpapiere gelegt, und durch Abrollen mit einer Pipette alle Luftblasen entfernt. Nach dem Schließen der Kammer erfolgt der Proteintransfer durch Anlegen einer Spannung von 0,8mA/cm² Membranfläche für 90min.

2.6.3 Immunologischer Nachweis

Für einen immunologischen Nachweis von Proteinen wird die Membran nach dem Blotten einmal kurz mit PBS-T (Kap. 2.2.4) gespült und dann für 1h in Blockierungslösung auf einem Schüttler bei RT inkubiert. In diesem Schritt werden noch vorhandene Proteinbindungsstellen

auf der Membran durch die in der Milch enthaltenen Proteine abgesättigt. Danach wird die Membran kurz zweimal mit PBS-T gewaschen und schließlich mit einer verdünnten Lösung des primären Antikörpers für mindestens 2h bei RT oder über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Nachdem der primäre Antikörper entfernt wurde, wird der Blot zweimal kurz und zweimal für je 10min mit PBS-T gewaschen. Anschließend wird die Membran noch mit dem in Blockierungslösung verdünnten sekundären Antikörper für mindestens 45min geschwänkt. Danach wird der Blot 3-5mal für je 10min in PBS-T gewaschen um alle Reste nicht gebundenen Antikörpers zu entfernen.

2.6.4 Detektion

Die Detektion der Proteine erfolgt über eine an den sekundären Antikörper gekoppelte, Meerrettichpreoxidase, die Luminol unter Aussendung von Photonen umsetzt. Das emittierte Licht kann dann auf einem Röntgenfilm oder über eine CCD-Kamera nachgewiesen werden.

Der Nachweis wird mit dem ECL+ Kit (Amersham Bioscience, Kat. RPN2133) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.6.5 „Strippen“ eines Western Blots

Die Bindung der Antikörper an die Proteine auf der Membran lassen sich für weitere Nachweise mit anderen Antikörpern wieder lösen. Dabei werden die Antikörper durch SDS, β -Mercaptoethanol und Wärme wieder von den Proteinen gelöst.

Die Membranen werden nach der Detektion kurz mit PBS-T gespült und dann in eine verschließbare Schale mit vorgewärmtem „Stripping-Puffer“ (Kap. 2.2.4) überführt, und in einem Wasserbad mit beweglichem Tisch für 30min bei 55°C langsam geschwänkt. Nach der Inkubation wird die Membran zweimal kurz und dreimal für je 10min mit PBS-T gewaschen und anschließend neu mit Blockierungslösung inkubiert. Die Membran kann dann im Weiteren erneut mit Antikörpern behandelt werden. So kann ein Blot bis zu viermal mit verschiedenen Antikörpern detektiert werden.

2.6.6 Quantifizieren eines Western Blots

Der Schwärzungsgrad einer Bande ist korreliert mit der Menge des aufgetragenen Proteins. Dies erlaubt es eine semiquantitative Aussage über die Proteinmenge, im Vergleich zu einem Proteinstandard in einem geeigneten Bezugssystem, zu treffen.

In dieser Arbeit wurden die mit der CCD Kamera des LAS-3000 Imagers (Fuji Film) gewonnenen Daten mit Hilfe der Image Gauge 3.01 (Fuji Film) Software ausgewertet.

2.6.7 Oberflächenbiotinylierung von Proteinen

Mit einer Oberflächenbiotinylierung kann nachgewiesen werden, ob ein bestimmtes Protein zu einem gegebenen Zeitpunkt auf der Oberfläche von Zellen exprimiert wird. Dies wird beispielsweise angewendet wenn durch Mutationen ein Transportdefekt vermutet wird, oder man einen Nachweis über Endozytose von membranständigen Proteinen führen will. Dazu werden Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt auf Eis gestellt um jegliche

Endozytoseaktivität zu unterbinden. Alle sich auf der Oberfläche der Zellen befindlichen Proteine werden durch ein aminoreaktives Biotinylierungs-Reagenz kovalent mit Biotin verknüpft. Bei dem Reagenz handelt es sich um ein N-hydroxysulfosuccinimidester (Sulfo-NHS) von Biotin, das unter Ausbildung einer neuen Amidbindung mit primären Aminogruppen der Oberflächenproteine reagiert und diese so mit Biotin markiert. Die Sulfonatgruppe des Reagenzes bedingt dessen Wasserlöslichkeit, verhindert aber dadurch die Membrangängigkeit. Dies gewährleistet, dass nur die membranständigen Proteine biotinyliert werden und keine intrazellulären. Nach einer Zelllyse mit anschließender Immunopräzipitation kann über einen Western Blot Biotin mit Hilfe von Streptavidin, ein Biotin-bindendes Protein, nachgewiesen werden.

Wenn keine geeigneten Antikörper zur Verfügung stehen, kann der Nachweis der Proteine auch über den Einbau radioaktiver Aminosäuren geführt werden. In dieser Arbeit wurde sowohl die radioaktive sowie die nichtradioaktive Nachweismethode angewandt.

2.6.7.1 Radioaktive Oberflächenbiotinylierung

Zur Analyse der Oberflächenexpression werden 293T Zellen mit der CaPO₄ Methode (Kap. 2.4.3.1) transfiziert und 24h nach Transfektion induziert (Kap. 2.4.4). Nach der Induktion werden die Zellen für 1h in je 3ml „Hungermedium“ (D-MEM, Meth⁻/Cys⁻) pro 6cm Schale gehalten, um in den Zellen verbliebene freie Aminosäuren „zu verbrauchen“. Daran anschließend wird das „Hungermedium“ durch ein radioaktives Markierungsmedium (D-MEM, Meth⁻/Cys⁻, 10% FCS, 10% D-MEM komplett, 7µl Promix/ml Medium [³⁵S-Meth, ³⁵S-Cys, 14,3 µCi/µl]) ersetzt und die Zellen darin über Nacht kultiviert. Am folgenden Tag werden die Zellen auf Eis überführt, um jede endozytotische Aktivität zu verhindern, und 3mal mit PBS⁺⁺ gewaschen. Anschließend wird 1ml des Biotinylierungsreagenzes, frisch gelöst in PBS⁺⁺ (1mg/ml), hinzugefügt und die Zellen für 30min auf Eis vorsichtig geschwänkt. Die Reaktion wird durch die Zugabe von 200µl 1M Glyzin in PBS⁺⁺ abgestoppt und die Zellen erneut 1mal mit PBS⁺⁺ gewaschen. Nach dem Waschen der Zellen werden diese mit 600µl des Lysepuffers I (Kap. 2.2.2) lysiert, die Zelltrümmer abzentrifugiert (Kap. 2.4.5), die Überstände in neue Eppendorf-Gefäße überführt, sowie mit 1/10 Volumen 10% Na-Deoxycolat/1% SDS versehen.

Auf die Markierung der Proteine folgt die Immunopräzipitation. Dazu werden 300µl des Lysates mit 4µl eines Präimmunserums (idealerweise aus der gleichen Spezies wie das darauffolgende Immunserum) für 1h bei 4°C auf einem Rotor gedreht. Unspezifisch an diese Antikörper gebundene Proteine werden dann nach der Inkubation mit Hilfe von Protein-A-Sepharose Kügelchen aus dem Lysat gefällt. Die Protein-A-Sepharose wurde dazu vorher in ein 15ml Falconröhrchen (10mg/Probe) eingewogen und in 10ml RIPA Puffer (Kap. 2.2.4) für eine 1h auf einem Rotor vorgequollen. Anschließend wird die Protein-A-Sepharose für 5min bei 2500rpm zentrifugiert und der RIPA Puffer Überstand abgesaugt. Es wird wieder so viel RIPA Puffer hinzugefügt, dass eine 1:1 Mischung entsteht. Zur Fällung der unspezifisch gebundenen Proteine werden pro Probe 50µl der gequollenen Protein-A-Sepharose hinzu gegeben und für 1h bei 4°C auf einem Rotor gedreht. Die so behandelten Lysate werden dann für 5min bei 14000rpm zentrifugiert, die Überstände in neue Eppendorf-Gefäße überführt und je 4µl des Immunserums (z.B. polyklonale Hasenserum, oder Seren infizierter Affen) hinzugefügt. Die neuerliche Inkubation erfolgt für 2h bei 4°C auf einem Rotor. Danach

werden 50µl der gequollenen Sepharose hinzugefügt und erneut für 2h bei 4°C inkubiert. Darauf folgend werden die Proben bei 14000rpm zentrifugiert, die Überstände verworfen, und das Sepharose Sediment dreimal mit RIPA Puffer und einmal mit 0,1% NP40 in 10mM Tris, pH8, gewaschen. Die Pellets werden in 50µl 2xPPPC aufgenommen und für 5min bei 95°C aufgekocht, um die, an die Sepharose gebundenen Proteine zu lösen. Abschließend werden dann die Proben auf einem Trizin-SDS-Gel aufgetrennt.

Für die Detektion wird ein Western Blot, gemäß Kap. 2.6.2, durchgeführt. Die Detektion von Biotin erfolgt über den Einsatz von Streptavidin-HRP. Dieses wird 1:10000 in PBS-T verdünnt und anstelle des primären Antikörpers auf den Blot gegeben, nachdem dieser in Blockierungslösung abgesättigt wurde. Die Detektion, sowie die Auswertung erfolgt wie in den Kap. 2.6.4 und 2.6.6 beschrieben. Um die radioaktiven Signale zu detektieren, wird die Blot Membran nach dem Abklingen des ECL⁺-Signals in Plastikfolien gelegt und über Nacht auf einem Röntgenfilm abgelegt und dieser dann am nächsten Tag entwickelt (Curix 60, Agfa).

2.6.7.2 Nicht-radioaktive Oberflächenbiotinylierung

Wenn geeignete Antikörper für die Detektion des Western Blots zur Verfügung stehen kann auf eine radioaktive Durchführung des Versuches verzichtet werden, was unter allen Umständen zu bevorzugen ist.

Auch hier werden 293T Zellen in 6cm Schalen mit der CaPO₄-Methode transfiziert und induziert. Es erfolgt kein Mediumwechsel mit radioaktivem Medium. Die Oberflächenbiotinylierung wird genau wie in Kap. 2.6.7 beschrieben durchgeführt. Für die Immunopräzipitation wird als Immunsereum ein Gemisch von je 4µl eines polyklonalen Hasensereums (α-LP 1-86) und einem Affensereum (Franka) verwendet.

Die Detektion mit Streptavidin-HRP wird genauso wie in Kap. 2.6.7.1 durchgeführt, des weiteren werden die Blots nicht auf Röntgenfilm abgelegt, sondern „gestrippt“ und mit weiteren Antikörpern entwickelt.

2.7 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Im Gegensatz zum normalen Mikroskop, in welchem das Bild eine Überlagerung aus einem scharfen Bild aus der Fokalebene und mehreren unscharfen Bilder aus Ebenen über und unter der Fokalebene besteht, ist das Bild eines konfokalen Mikroskops stets scharf. Dies wird dadurch erreicht, dass das Anregungslicht mittels eines Lasers in die Probe hineinfokussiert wird. Optische Informationen, die nicht aus der Fokalebene stammen, werden auf zwei Wegen unterdrückt. Zum einen ist das emittierte Licht ausserhalb der fokussierten Ebene sehr schwach, zum anderen wird das Licht nicht auf die Lochblende fokussiert und gelangt somit nicht zum Detektor. Da man aber so nur einen einzelnen Licht- bzw. Fokuspunkt auflösen kann ist es notwendig die Probe abzutasten, oder abzurastern und das so entstandene Bild auf einem Computer zusammenzusetzen. Die meisten konfokalen Mikroskope sind deshalb konfokale Laser-Scanning-Mikroskope (CLSM; confocal laser scanning microscope), deren Prinzip 1955 von Marvin Minsky entwickelt wurde. Bei einem solchen Mikroskop rastert ein Laserstrahl die Probe ab, wobei er sich in einer konstanten Ebene im maximalen Fokus befindet. Die Dicke des optischen Schnittes wird

bedingt durch die numerische Apertur des Mikroskopobjektivs sowie durch den Durchmesser der Lochblende. Bei sehr enger Blende und einem sehr guten Objektiv kann die abgebildete Ebene eine Dicke von unter 1µm besitzen. Definiert man verschiedene Schnitthöhen, bzw. Fokusebenen, erhält man eine Schichtung und kann daraus am Computer eine dreidimensionale Rekonstruktion des abgebildeten Objektes erstellen.

Der gleichzeitige Einsatz verschiedener Laser und geeigneter Filtersysteme ermöglicht es verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe innerhalb einer Probe zu messen und die Strahlengänge, abhängig von der Wellenlänge des emittierten Lichts, in verschiedene Detektoren zu lenken, die bestimmten Farben zugeordnet sind. Neben der Wahl der Filtersätze ist auch die Wahl der Fluorochrome von größter Bedeutung. So lassen sich manche Farbstoffe nicht parallel messen, da ihre Emissionsspektren zu nah beieinander liegen, und diese nicht durch Filter getrennt, bzw. ausgeschlossen werden können. Das trifft zum Beispiel auf die häufig Verwendung findenden Proteine GFP (green fluorescent protein; Abs:498nm, Em:516nm) und YFP (yellow fluorescent protein; Abs:520nm, Em:532nm) zu.

Im konfokalen Mikroskop lassen sich die Proteine direkt durch Eigenfluoreszenz (z.B. GFP), oder indirekt über eine Antikörperfärbung nachweisen. An die spezifischen Antikörper sind Farbstoffe gekoppelt, die dann ihrerseits über eine Laseranregung detektiert werden können.

In dieser Arbeit wurde eine Kombination aus drei Farben gewählt, die aufgrund ihrer relativ weit auseinander liegenden Farbspektren, in einer Probe gemeinsam detektiert werden konnten.

Fluorochrom	Absorption	Emission
DAPI	359	461
GFP/YFP	498/520	516/532
Cherry (dsRed)	556	583

Die Aufnahmen dieser Arbeit wurden an einem LSM 510 Mikroskop (Zeiss) aufgenommen und über das „open-source“ Program ImageJ (www.ImageJ.com) ausgewertet.

Als Zellen für die konfokale Mikroskopie wurden in dieser Arbeit HT1080 Zellen verwendet, da sie im Vergleich zu 293T Zellen weniger erhaben sind und relativ viel Zytoplasma haben.

2.7.1 Zellkultur und Transfektion

HT1080 wurden auf mit Poly-L-Lysinen (Molekulargewicht: 30000-70000kD) beschichteten Deckgläsern in 12-well Platten mit einer Zellzahl von 3×10^5 ausgesäht.

Poly-L-Lysine sind positiv geladene Polypeptide, die die negative Ladung der gläsernen Deckgläser maskieren. Dies führt zu einer geringeren elektrostatischen Abstoßung zwischen der Glasoberfläche und der Zellmembran und somit zu einer erhöhten Zelladhärenz.

Die ausgesähten Zellen werden mit EugeneHD transfiziert (Kap. 2.4.3.3) und nicht mit Na-Butyrat induziert. Die Fixierung und Färbung erfolgt je nach Versuchsansatz 24h oder 48h nach der Transfektion.

2.7.2 Antikörperfärbung der Zellen (Immunofluoreszenz)

Die Immunofluoreszenz findet beim Nachweis nicht selbstfluoreszierender Proteine Anwendung. Dazu werden die Zellen nach der Transfektion (Kap. 2.4.3.3) einmal mit PBS gewaschen und anschließend für 15-30min bei RT in 3% Paraformaldehyd fixiert. Danach werden die Zellen viermal mit PBS/Glyzin gewaschen. An diesem Punkt ist eine Lagerung der Zellen bei 4°C für mehrere Tage möglich, was bei einem Zeitverlaufsexperiment wichtig ist. Nach dem Waschen werden die Zellen, immer noch in den 12-well Platten, durch die Zugabe von 0,1% Triton X100 permeabilisiert, wodurch eine Färbung intrazellulärer Proteine durch Antikörper erst möglich wird. Nach der Permeabilisierung werden die Zellen erneut zweimal mit PBS/Glyzin gewaschen und für 10min in Blocklösung (Kap. 2.2.5) blockiert. Währenddessen werden die primären Antikörper in Blocklösung verdünnt und in einem Volumen von 30µl auf Parafilm getropft. Die Deckgläser werden mittels einer Uhrmacherpinzette aus den jeweiligen Kavitäten der 12-well Platte herausgeholt und mit den Zellen nach unten auf den Tropfen verdünnter Antikörperlösung gelegt. Nach 30min bei RT werden die Deckgläser in die 12-well Platten zurückgelegt, mit den Zellen nach oben, und diese 3-4mal mit PBS/Glyzin für 20min gewaschen. Während dieser Zeit werden die sekundären Antikörper 1:2000 (1µg/ml) mit Blocklösung verdünnt und auch auf Parafilm ausgebracht (30µl). Die Deckgläser werden erneut mit einer Pinzette umgekehrt auf die jeweiligen Antikörpertropfen gelegt und für 30min, abgedunkelt, inkubiert. Das Abdunkeln soll ein vorschnelles Ausbleichen der an die Antikörper gekoppelten Farbstoffe verhindern. Danach werden die Zellen zweimal mit PBS/Glyzin gewaschen. Eine Kernfärbung mit DAPI folgt darauf (1:10000 in PBS/Glyzin), indem 1ml Färbelösung in die jeweiligen Kavitäten getropft und dort für 5min belassen wird. Die Zellen werden danach noch einmal mit PBS/Glyzin gewaschen, einmal mit A. dest. und dann auf einen vorbereiteten Objektträger gelegt. Auf diesem Objektträger befindet sich ein Tropfen Moviol mit DABCO (1,4-diaminobenzol) zum Eindecken. Die Proben werden über Nacht bei RT im Dunklen getrocknet.

2.7.3 Färbung von Zellen mit Eigenfluoreszenz

Wenn Proteine mit Eigenfluoreszenz transfiziert wurden entfällt die Detektion mittels primärer und sekundärer Antikörper. Hierbei werden die Zellen wie in Kap.2.7.2 beschrieben fixiert und permeabilisiert. Auf die Permeabilisierung folgen drei Waschschritte und die Kernfärbung mit DAPI. Daraufhin werden die Zellen mit PBS/Glyzin, sowie mit A. dest. gewaschen und im Dunklen eingedeckelt.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse des N-Glykosylierungsmusters von PFV Env

Durch Sequenzanalysen des foamyviralen Hüllproteins wurden 15 potentielle N-Glykosylierungsstellen (NGS) identifiziert. Sie haben die allgemeine Erkennungssequenz N-X-S/T, wobei X jede beliebige Aminosäure außer Prolin sein kann. Die Zuckerreste werden innerhalb der Erkennungssequenz an die Asparaginreste (N) angehängt. Die potentiellen NGS liegen verteilt über alle drei Env-Domänen, wobei zwei NGS auf das Leaderpeptid (LP) fallen, zehn auf die Oberflächenuntereinheit (SU) und drei auf die Transmembranuntereinheit (TM) (Abb.3A). N-Glykosylierungen spielen eine wichtige Rolle während der Reifung und des Transports viraler Glykoproteine. Eine Mutation der ersten Aminosäure des Motivs, dem Asparagin, führt zu einem Verlust der Glykosylierung, ebenso wie eine Mutation der dritten Aminosäure. Obwohl diese selbst nicht glykosyliert wird führt ein Austausch dieser Aminosäure zu einer Zerstörung der Erkennungssequenz. Eine Mutation der mittleren Aminosäure hat, sofern durch die eingeführte Aminosäure keine sterischen oder ladungsbedingten Komplikationen auftreten, keinen Einfluß auf die Glykosylierung. In einer initialen Studie wurden alle 15 möglichen NGS durch einen Aminosäureaustausch inaktiviert, um die tatsächliche Nutzung und deren Bedeutung im viralen Replikationszyklus zu analysieren. Zur Inaktivierung dieser Glykosylierungsstellen wurden die Motive N-X-S/T durch Q-X-S/T ersetzt. Dabei handelt es sich um einen konservativen Aminosäureaustausch, da der Austausch von Asparagin durch Glutamin keine Änderung in der Konformation des Proteins bewirken sollte weil Ladung und Größe der beiden AS zu vergleichen sind. Diese Klonierungen basierten auf dem wildtypischen Env-Expressionskonstrukt pczHFVenvEM002 (Abb.14) und die Mutationen wurden mittels „Overlap-PCR“ (Kap. 2.3.1) eingeführt.

Bei einer biochemischen Analyse der Zelllysate transfizierter 293T Zellen konnte man deutliche Unterschiede in der Mobilität der Env-Vorläuferbanden gp130^{Env} erkennen (Abb.10B). So liefen die Banden der Glykosylierungsmutanten Δ N2- Δ N15 niedriger als die des Wildtyps, was auf eine fehlende Glykosylierung hindeutet (Abb.10B, Spur 2-15). Im Gegensatz dazu lief die Bande der Δ N1 Mutante auf der gleichen Höhe wie die des Wildtyps (Abb.10B, Spur 1, 16), was den Schluß zulässt, dass diese NGS nicht genutzt wird. Des Weiteren konnte keine Freisetzung viraler Partikel für die Mutante Δ N8 nachgewiesen werden (Abb.10, Spur 8) und eine, im Vergleich zum Wildtyp, nur schwache für die Mutanten Δ N13 und Δ N15 (Abb.10, Spur 13, 15). Diese fehlende Partikelfreisetzung einzelner Proben ist wahrscheinlich auf einen Defekt der entsprechenden Hüllproteinmutanten zurück zu führen, da in allen Zellen das Kapsidprotein Gag in ausreichenden, vergleichbaren Mengen vorlag (Abb.10A). Folgerichtig zeigten diese Mutanten auch in Infektionsstudien einen stark vom Wildtyp abweichenden Phänotyp. Die Δ N8 Mutante ist nicht infektiös, die Mutanten Δ N13 und Δ N15 in nur geringem Maße. Die anderen Mutanten unterschieden sich hinsichtlich ihres Phänotyps nicht signifikant vom Wildtyp (Abb.11).

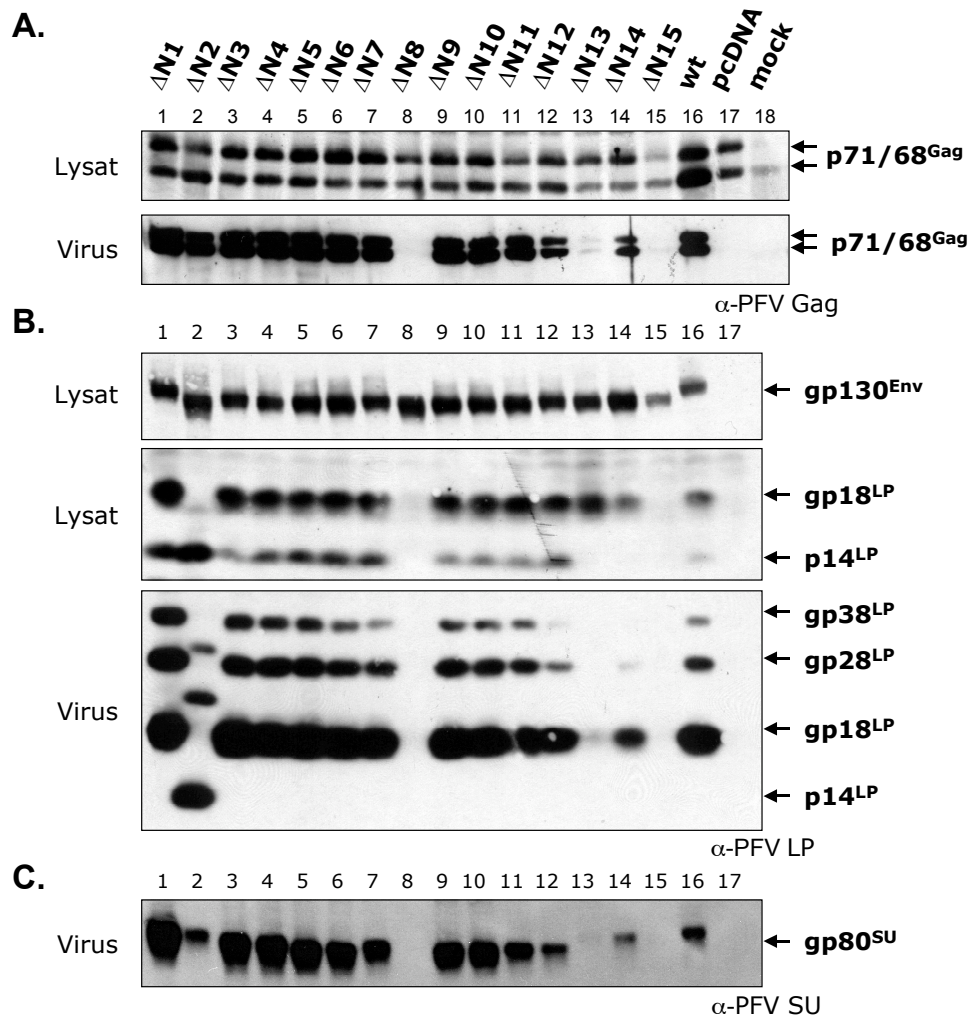


Abbildung 10: Biochemische Analyse der N-Glykosylierungsmutanten

Western Blot Analyse von transfizierten 293T Zellen (Lysat) und aufgereinigten PFV-haltigen Zellkulturüberständen (Virus). Die Zellen wurden mit Ca_2PO_4 nach der Standardmethode transfiziert. Nach 48h p.T. wurden Zelllysate und Überstände gewonnen. Viruspartikel wurden über 20% Sucrose aufgereinigt. Alle Env-Expressionsplasmide wurden mit dem PFV Vektor pMH118 kotransfiziert. **(A)**: Anti-PFV Gag SGG1 (Hybridomaüberstand), **(B)**: Anti-PFV LP 1-86 (polyklonales Hasenserum), **(C)**: Anti-PFV SU P3E10 (Hybridomaüberstand); $\Delta\text{N}1$: pczHFVenvEM058, $\Delta\text{N}2$: pczHFVenvEM077, $\Delta\text{N}3$: pczHFVenvEM078, $\Delta\text{N}4$: pczHFVenvEM105, $\Delta\text{N}5$: pczHFVenvEM106, $\Delta\text{N}6$: pczHFVenvEM107, $\Delta\text{N}7$: pczHFVenvEM108, $\Delta\text{N}8$: pczHFVenvEM109, $\Delta\text{N}9$: pczHFVenvEM110, $\Delta\text{N}10$: pczHFVenvEM111, $\Delta\text{N}11$: pczHFVenvEM112, $\Delta\text{N}12$: pczHFVenvEM113, $\Delta\text{N}13$: pczHFVenvEM114, $\Delta\text{N}14$: pczHFVenvEM115, $\Delta\text{N}15$: pczHFVenvEM116, wt: pczHFVenvEM002, mock: pMH118 + pcDNA3.1zeo.

Einen Hinweis auf einen Prozessierungsdefekt bzw. einen Transportdefekt lieferten die drei phänotypisch auffälligen Mutanten durch die Tatsache, dass sie alle, eine dem Wildtyp ähnliche, Expression des Vorläuferproteins zeigen sich aber hinsichtlich der Detektierbarkeit der LP Bande unterscheiden. Bei der Mutante $\Delta\text{N}8$ kann kein LP Spaltprodukt nachgewiesen werden, bei den Mutanten $\Delta\text{N}13$ und $\Delta\text{N}15$ in nur geringem Maße (Abb.10B, Spur 8, 13, 15).

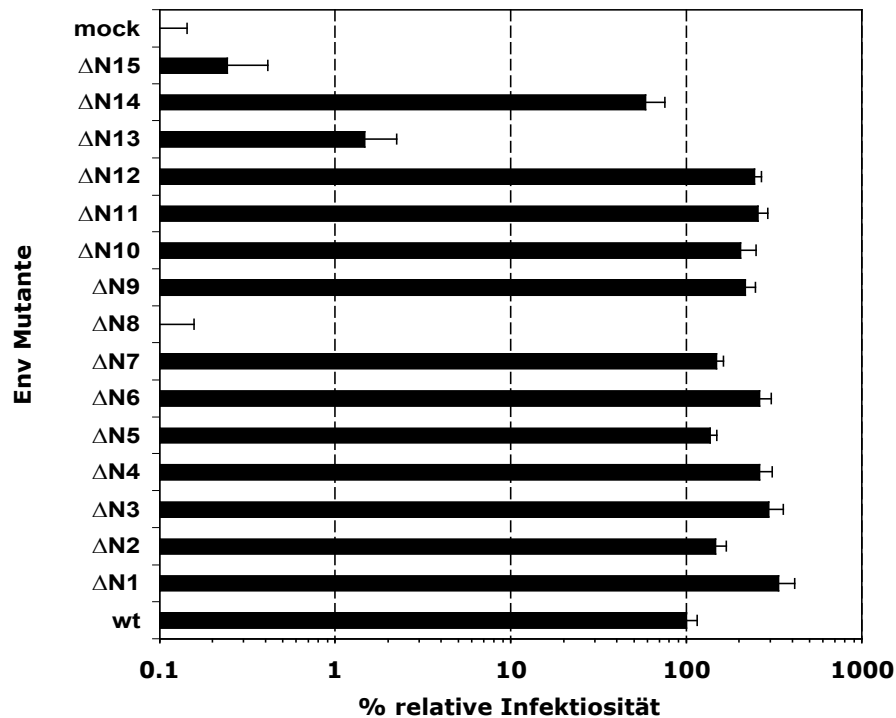


Abbildung 11: Infektionsanalyse der NGS-Mutanten

FACS Analyse infizierter HT1080 Zellen. 293T Zellen wurden Ca_2PO_4 transfiziert und die Überstände 48h p.T gewonnen. Die Infektion erfolgte für 6h, die FACS Analyse 48h nach Infektion. Alle Env-Mutanten wurden mit einem PFV Vektor kotransfiziert, der eine eGFP-Reportergen-kassette enthält. Die Werte des Wildtyps wurden in einem relativen Bezugssystem auf 100% gesetzt (n=4). wt: pczHFVenvEM002, ΔN1: pczHFVenvEM058, ΔN2: pczHFVenvEM077, ΔN3: pczHFVenvEM078, ΔN4: pczHFVenvEM105, ΔN5: pczHFVenvEM106, ΔN6: pczHFVenvEM107, ΔN7: pczHFVenvEM108, ΔN8: pczHFVenvEM109, ΔN9: pczHFVenvEM110, ΔN10: pczHFVenvEM111, ΔN11: pczHFVenvEM112, ΔN12: pczHFVenvEM113, ΔN13: pczHFVenvEM114, ΔN14: pczHFVenvEM115, ΔN15: pczHFVenvEM116, mock: pcDNA3.1zeo + pMH118.

Ein interessanter Befund ist der Unterschied in der Mobilität der LP Banden der ΔN2 Mutante (Abb.10B, Spur 2) im Vergleich zu den Mutanten ΔN1 und ΔN3 (Abb.10B, Spur 1, 3). Die von Wang und Kollegen (Wang et al., 1999) vorhergesagte Signalpeptidase-Schnittstelle bei der Aminosäure C_{86} des Leaderpeptids stellt nicht die Sequenz dar an der das PFV Env tatsächlich prozessiert wird. Dies konnte durch Mutationsanalysen gezeigt werden (Lindemann et al., 2001). Hingegen führte die Mutation der Aminosäure G_{148} , die Teil eines durch alle FV-Spezies hindurch konservierten Tetrapeptids ist, zu einem beinahe kompletten Verlust der Prozessierung (Lindemann et al., 2001). Die beobachtete Größe der LP Banden von 17,4kD wäre jedoch zu klein für ein Spaltprodukt von 148aa Länge, sondern entspräche ungefähr einem Peptid mit einer Länge von ca. 120 AS (Lindemann et al., 2001). Ginge man aber davon aus, dass die Spaltung nach der Aminosäure G_{148} stattfände, lägen die ersten drei NGS noch in der LP Domäne. Durch biochemische Analysen von PFV Glykoproteinmutanten konnte anhand der Env-Vorläuferbanden gezeigt werden, dass die potentiellen N-Glykosylierungsstellen ΔN2 und ΔN3 im Gegensatz zu ΔN1 tatsächlich glykosyliert werden (Abb.10B, Spur 1-3). Betrachtet man aber die LP-Banden lässt sich ein verändertes Laufverhalten durch eine fehlende Glykosylierung nur für die ΔN2 Mutante nachweisen (Abb.10B, Spur 1-3). Diese Bande läuft um einen Wert von ca. 4,5kD niedriger,

im Zelllysats auf Höhe der nichtglykosylierten LP-Variante p14^{LP}. Die Banden der Mutanten $\Delta N1$ und $\Delta N3$ hingegen laufen auf gleicher Höhe bei ca. 18kD. Dies ist bei der $\Delta N1$ Mutante durch die fehlende Glykosylierung zu erklären, die Mutante $\Delta N3$ jedoch sollte, wenn sie im LP läge, auf der Höhe der $\Delta N2$ Mutante zu detektieren sein, dennoch läuft sie auf der Höhe der wildtypischen LP Bande. Der Env-Vorläufer hingegen läuft schneller als der des Wildtyps, was auf eine Glykosylierung hindeutet, ebenso wie die SU Bande der $\Delta N3$ Mutante. Den schwereren LP Banden der $\Delta N2$ Mutante könnte auch eine alternative Prozessierung zu Grunde liegen. Dies erscheint aber unwahrscheinlich, da alle höher molekularen Banden in den PFV Partikeln ebenfalls um einen vergleichbaren Wert leichter sind (Abb.10B, Spur2). Diese Befunde legen die Vermutung nahe, dass die dritte NGS nicht mehr im Leaderpeptid, sondern bereits in der SU-Domäne liegt. Das würde bedeuten, dass die LP/SU-Schnittstelle weder wie von Wang und Kollegen (Wang et al., 1999) vorhergesagt bei C₈₆, noch bei der Aminosäure G₁₄₈ läge, sondern in einem Bereich zwischen den Aminosäuren 109 ($\Delta N2$) und 141 ($\Delta N3$). Dies wäre auch mit dem beobachteten molekularen Gewicht der LP Banden besser vereinbar. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde in unserem Labor die genaue Position der Prozessierungsstelle bestimmt. Es konnte durch Mutationsanalysen und N-terminale Proteinsequenzierung gezeigt werden, dass im Einklang mit den aus den Glykosylierungsstudien gewonnenen Erkenntnissen, die Spaltung zwischen der LP- und SU-Domäne nach der Aminosäure R₁₂₆ stattfindet (Duda et al., 2004). Auch wird die Schnittstelle nicht von einer Signalpeptidase, sondern von Furin, oder einer furin-ähnlichen Peptidase, prozessiert. Mit diesen Befunden konnte die unterschiedliche Mobilität und Größe der LP Banden gut erklärt werden.

3.1.1 Oberflächenbiotinylierung der phänotypischen NGS-Mutanten

Verschiedene Befunde deuten daraufhin, dass die Prozessierung foamyviraler Hüllproteine im Golgi-Netzwerk stattfindet (Pietschmann et al., 2000). Kohlenhydratketten spielen eine wichtige Rolle bei der Reifung, Faltung und „Qualitätskontrolle“ von Proteinen während ihres intrazellulären Transports durch das ER und den Golgi-Apparat. Wie bereits gezeigt wurde, kann die Inaktivierung einer einzelnen N-Glykosylierungsstelle zu einem Verlust jeglicher nachweisbarer Prozessierung führen. Das scheint bei der $\Delta N8$ Mutante der Fall zu sein, und in weniger drastischer Form auch auf die Mutanten $\Delta N13$ und $\Delta N15$ zutreffen. Ob diese fehlende Prozessierung auch mit einem Transportdefekt einhergeht, sollte im Folgenden untersucht werden.

Mit Hilfe der Oberflächenbiotinylierung von Zellen kann man eine Aussage über die Expression von bestimmten Proteinen auf der Zelloberfläche zu einem gegebenen Zeitpunkt treffen. Dazu wurden 293T Zellen gemäß den Kap. 2.4.3.1 und 2.4.4 mit Ca₂PO₄ transfiziert und induziert. Die Kultivierung der Zellen im Hunger- und radioaktivem Medium (Kap. 2.6.7.1) erfolgte vor der Zelllyse und Aufbereitung der Proben. Die Vorinkubation wurde mit einem PFV negativen Humanserum durchgeführt und die Immunopräzipitation mit einem PFV positiven Schimpansen Serum (Fischer et al., 1998; Lindemann und Rethwilm, 1998). Nach einer Trizin-SDS-Gelelektrophorese (Kap. 2.6.1) mit angeschlossenen Western Blot (Kap. 2.6.2) wurden die biotinylierten Proteine mit Streptavidin-HRP detektiert (Abb.12A).

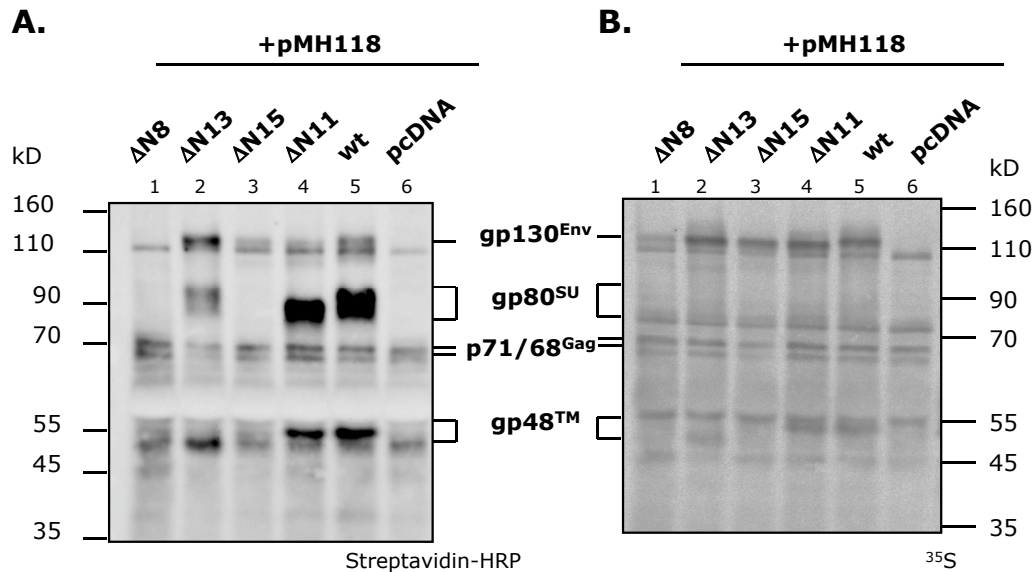


Abbildung 12: Oberflächenexpression ausgewählter N-Glykosylierungsmutanten

293T Zellen wurden nach einer Ca_2PO_4 Transfektion radioaktiv markiert (^{35}S) und Proteine auf der Zelloberfläche selektiv mit Biotin markiert. Nach einer Immunopräzipitation und einem Western Blot wurden die auf der Oberfläche der transfizierten Zellen exprimierten Proteine mit Streptavidin-HRP detektiert (**A**). Zelluläre Env Expression wurde durch Ablegen der Membran auf Röntgenfilm visualisiert (**B**). Alle Zellen mit transfizierten Env-Expressionsplasmiden wurden mit einem Gag/Pol exprimierenden PFV Vektor kotransfiziert. ΔN8 : pczHFVenvEM109, ΔN13 : pczHFVenvEM114, ΔN15 : pczHFVenvEM116, ΔN11 : pczHFVenvEM112, wt: pczHFVenvEM002, pcDNA3.1zeo, pMH118: replikationsdefizienter PFV Gag/Pol Vektor.

In den Spur der Kontrollproteine ΔN11 und wt (Abb.12A, Spur 4, 5) kann eine deutliche Biotinmarkierung und somit Oberflächenexpression der Vorläuferproteine ($\text{gp130}^{\text{Env}}$) gezeigt werden. Darüber hinaus sieht man auf der Höhe von ca. 80kD biotinylierte SU Banden, sowie die TM Banden bei ca. 50kD. Für die ΔN8 Mutante kann weder eine Vorläuferbande, noch irgendein Prozessierungsprodukt auf der Oberfläche detektiert werden (Abb.12A, Spur 1). Bei der Mutante ΔN15 hingegen ist das Signal des Vorläuferproteins $\text{gp130}^{\text{Env}}$ etwa gleich stark wie bei der ΔN11 Mutante und dem Wildtyp, die Prozessierungsprodukte SU und TM lassen sich jedoch nicht oder nur schwach nachweisen (Abb.12A, Spur 3). Die Mutante ΔN13 zeigt auf der Zelloberfläche von allen Hüllproteinen das stärkste Vorläufersignal (Abb.12A, Spur 2), aber nur eine vergleichsweise schwache Expression der prozessierten Untereinheiten SU und TM. Die unterschiedlichen Laufhöhen der SU und TM Banden kommen durch das Fehlen bestimmter Zuckerreste der jeweiligen Mutanten zustande (Abb.12A, Spur 2, 4, 5).

Die gesamte zelluläre PFV Env-Expression der Zelle konnte durch das Autoradiogramm gezeigt werden (Abb.12B). Obgleich die $\text{gp130}^{\text{Env}}$ Bande für die ΔN8 Mutante schwächer erscheint als die der anderen Hüllproteine, ist eine klare Expression nachweisbar (Abb.12B, Spur 1). Für alle anderen Env Proteine konnte kein wesentlicher Unterschied in der zellulären Expression gezeigt werden (Abb.12B, Spur 2-5).

Diese Ergebnisse legen den Schluß eines Defektes im Transport an die Oberfläche und der Prozessierung für die Mutanten ΔN8 , ΔN13 und ΔN15 nahe, da zwar eine deutliche zelluläre Expression des Vorläufers, aber keine oder nur eine geringe Expression des

Hüllproteins auf der Zelloberfläche zu beobachten ist. Dies gilt in besonderer Weise für die $\Delta N8$ Mutante.

3.1.2 Klonierung neuer NGS-Mutanten

Die drei phänotypischen NGS Mutanten $\Delta N8$, $\Delta N13$ und $\Delta N15$ sollten noch eingehender untersucht werden. Die eingeführten Mutationen haben zu Phänotypen geführt die keine oder eine stark verringerte Infektiosität und Partikelfreisetzung zeigen. Auch ist die Prozessierung des Hüllproteins für manche Mutanten nicht mehr, oder nur in geringem Maße nachweisbar. Möglicherweise sind aber nicht nur die fehlenden Glykosylierungen an der Ausbildung dieser Phänotypen beteiligt, sondern die Mutationen selbst, auch wenn es sich stets um konservative Aminosäureaustausche gehandelt hat. Dafür wurden neue Env-Expressionskonstrukte hergestellt, die weitere Mutationen in den N-Glykosylierungsmotiven tragen. Zwei Sätze von je drei Mutanten wurden hergestellt, bei welchen jeweils eine bestimmte Aminosäure im N-Glykosylierungsmotiv durch eine andere ersetzt wurde. Die Konstrukte des ersten Satzes ($\Delta NX.1$) tragen einen konservativen Aminosäureaustausch jeweils an der dritten Stelle des N-X-S/T Motivs, die Expressionsplasmide des zweiten Satzes ($\Delta NX.2$) haben die natürliche, mittlere Aminosäure konservativ ersetzt (Abb.13). Die dritte Aminosäure des N-X-S/T Motivs ist genau wie die erste essentiell für das Anhängen von Zuckergruppen, wohingegen der Austausch der mittleren Aminosäure keinen Einfluß auf die Glykosylierung haben sollte.

Alle Klonierungen basieren auch hier auf dem wildtypischen Env-Expressionsplasmid pczHFVenvEM002 (Abb.14). Die durch Restriktionsverdaus hergestellten Fragmente wurden über eine präparative Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (Kap. 2.3.4), und mit dem GeneClean Turbo Kit (Qiagen) aufgereinigt (Kap. 2.3.5).

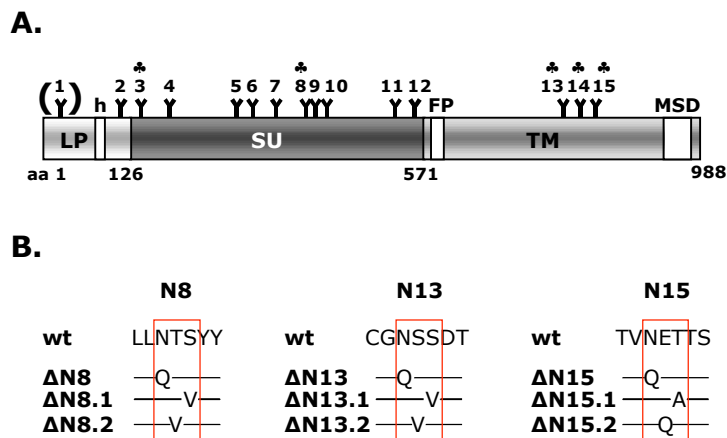


Abbildung 13: Schematische Übersicht über die PFV Env Organisation

(A): Schematische Übersicht über die PFV Env Domänenorganisation. (B): Sequenzvergleich der Glykosylierungsstellen des Wildtyps und der NGS-Mutanten $\Delta N8$, $\Delta N13$ und $\Delta N15$. h: hydrophobe Domäne im LP, FP: Fusions-Peptid, MSD: membranspannende Domäne, Y: potentielle Glykosylierungsstellen, *: in allen FV-Spezies konservierte NGS.

pczHFVenvEM131 (Δ N8.1), pczHFVenvEM151 (Δ N8.2)

Fragment	Enzyme	Länge [bp]
Vektor	MluI / NheI / CIAP	4520
1.Insert	MluI / PstI	1817
3.Insert	StuI / NheI	1122

Die PCR-Fragmente wurden mittels „Overlap-PCR“ hergestellt. Die mutagenen Primer der Δ N8.1 Mutante waren die Oligonukleotide 1314 und 1313, die der Δ N8.2 Mutante die Primer 2196 und 2195, mit den Außenprimern 525 und 531. Der zweite PCR-Schritt erfolgte mit den Außenprimern 815 und 825. Das entstandene Fragment wurde mit den Enzymen PstI und StuI geschnitten.

pczHFVenvEM132 (Δ N13.1), pczHFVenvEM152 (Δ N13.2)

Fragment	Enzyme	Länge [bp]
Vektor	Bpu1102I / Kpn2I / CIAP	5715
1.Insert	Kpn2I / MfeI	1741

Die PCR-Fragmente der Mutanten Δ N13.1 und Δ N13.2 wurden mit den mutagenen Primern 1316 und 1315, sowie 2198 und 2197, und den Außenprimern 633 und 393 ebenfalls über eine „Overlap-PCR“ generiert. Das DNA Fragment wurde dann mit den Restriktionsenzymen MfeI, Bpn1102I und XbaI geschnitten.

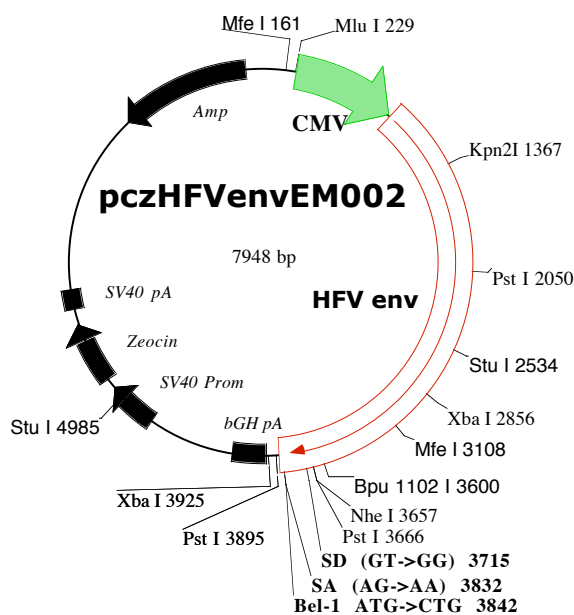


Abbildung 14: Schematische Darstellung des wildtypischen PFV Env Expressionskonstrukts pczHFVenvEM002

Das Plasmid basiert auf dem eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1zeo (Invitrogen). Dargestellt sind die wichtigsten Komponenten des Vektors, sowie die für die Klonierungen verwendeten Schnittstellen. Im Env ORF sind der interne Spleißdonor (SD), der Spleißakzeptor (SA), sowie das Bel-1 ATG inaktiviert.

bGH pA: polyA-Sequenz des bovinen Wachstumshormons, SV40 Prom: Promotor des SV40 Virus, Zeocin: Zeocinresistenzgen, SV40 pA: polyA-Sequenz des SV40 Virus, Amp: Ampicillinresistenzgen

pczHFVenvEM133 (Δ N15.1), pczHFVenvEM153 (Δ N15.2)

Fragment	Enzyme	Länge [bp]
Vektor	Bpu1102I / Kpn2I / CIAP	5715
1.Insert	Kpn2I / MfeI	1741

Die Mutationen der 3.NGS wurden mittels „Overlap-PCR“ mit den mutagenen Primern 1318 und 1317 (Δ N15.1) und 2200 und 2199 (Δ N15.2) eingeführt. Die Außenprimer waren 633 und 393. Das hergestellte DNA Fragment wurde mit den Enzymen MfeI, Bpu1102I und XbaI geschnitten.

3.1.3 Biochemische Analyse der neuen NGS-Mutanten

Die Mutanten mit einem Austausch der dritten Aminosäure (Δ NX.1) wurden wie in den Kapiteln 2.4.3.1 und 2.4.4 beschrieben mit einem foamyviralen Vektor in 293T Zellen Ca_2PO_4 transfiziert und induziert. Zelllysate (Kap. 2.4.5) wurden 48h nach Transfektion hergestellt, ebenso wie die Aufreinigung der Viruspartikel über 20% Sucrose (Kap. 2.5.6). Die so hergestellten Proben wurden über ein 7,5% Trizin-SDS-Gel aufgetrennt (Kap.2.6.1) und mittels eines Western Blots (Kap. 2.6.2) auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die darauf folgende Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen PFV Env LP und PFV Gag (Abb.5).

Bei der Analyse der Zelllysate sind die Vorläuferproteine aller Δ NX.1-Mutanten in annähernd gleichem Maße zu erkennen (Abb.15A, Spur 1, 3, 6, 9, 11). Die Banden für das gp18^{LP}-Prozessierungsprodukt ließen bei allen Mutanten mit Ausnahme der Δ N8.1 in unterschiedlicher Intensität nachweisen. Für die Mutanten Δ N13.1 und Δ N15.1 waren die Signale allerdings sehr schwach (Abb.15A, Spur 6, 9). Gag wurde in allen Zellen, mit Ausnahme denen der Δ N15 Probe, bei welcher die Expression geringfügig schwächer erscheint, in vergleichbaren Mengen exprimiert (Abb.15A).

Eine Partikelfreisetzung konnte für alle Δ NX.1-Mutanten mit Ausnahme der Δ N8.1 gezeigt werden, wenn auch in unterschiedlicher Stärke (Abb.15B, Spur 3, 6, 9). Eine starke Partikelfreisetzung war für den Wildtyp und die Δ N11 Mutanten nachweisbar (Abb.15B, Spur 11, 12). Man sieht deutlich das gp18^{LP}-Prozessierungsprodukt, sowie die höher molekularen Varianten gp28^{LP} und gp38^{LP}.

Die drei ursprünglichen NGS-Mutanten zeigen auch hier ein Bild wie in Abb.10. Die Δ N8 Mutante setzt keine Viruspartikel mehr frei (Abb.15B, Spur 2), wohingegen die Freisetzung bei den Mutanten Δ N13 und Δ N15 im Vergleich zum Wildtyp drastisch verringert ist (Abb.15B, Spur 5, 8, 12). Für die Δ N8.1 Mutante, die die dritte Aminosäure in dem N-Glykosylierungsmotiv ersetzt trägt, kann man keinerlei Partikelfreisetzung erkennen, wohingegen für die Mutanten Δ N13.1 und Δ N15.1 mit aufsteigender Intensität virale Banden nachzuweisen sind (Abb.15B, Spur 3, 6, 9). Dieser Anstieg in der Menge der freigesetzten viralen Partikel ist gut an der Intensität der Gag Banden zu erkennen (Abb.15B). Bei der Mutante Δ N13.1 sind im Gegensatz zum Wildtyp und der Δ N11 Mutante die höher molekularen LP Varianten nur sehr schwach zu sehen.

Die Analyse der essentiellen Aminosäuren an den Positionen eins und drei in den N-Glykosylierungsmotiven N-X-S/T brachten Mutanten hervor, die sich in ihren phänotypischen Erscheinungsbildern ähneln. Eine Mutation der achten NGS führt zu einem Phänotyp, der

keine erkennbare Partikelfreisetzung sowie eine stark erniedrigte Prozessierung des FV Hüllproteins zeigt. Auch deuten Anzeichen auf einen Transportdefekt dieser Mutante hin, da sich keine viralen Hüllproteine dieser Mutante auf der Oberfläche transfizierter Zellen nachweisen ließen (Abb.12A, Spur 1). Zwei weitere N-Glykosylierungsstellen scheinen essentiell für die Funktionalität des PFV Env zu sein. Aminosäureaustausche in der 13. und 15. NGS führen zu Mutanten, die eine im Vergleich zum Wildtyp deutlich herabgesetzte Env-Prozessierung, sowie eine verringerte Partikelfreisetzung zeigen.

Um diese N-Glykosylierungsstellen abschließend zu charakterisieren, wurden Mutanten hergestellt, bei welchen die mittlere Aminosäure durch einen konservativen Austausch ersetzt ist. Diese Veränderung sollte keinen Einfluß auf eine Glykosylierung des Proteins haben.

Nach einer Ca_2PO_4 Transfektion von 293T Zellen mit der Env-Expressionsplasmide mit einem PFV Vektor (Kap. 2.4.3.1), mit anschließender Induktion (Kap.2.4.4), wurden Zelllysate hergestellt, sowie virushaltige Zellkulturüberstände über 20% Sucrose aufgereinigt (Kap. 2.4.5 und 2.5.6). Die gewonnenen Proben wurden in einem 7,5% Trizin-SDS-Gel (Kap. 2.6.1) aufgetrennt und es wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt (Kap.2.6.2).

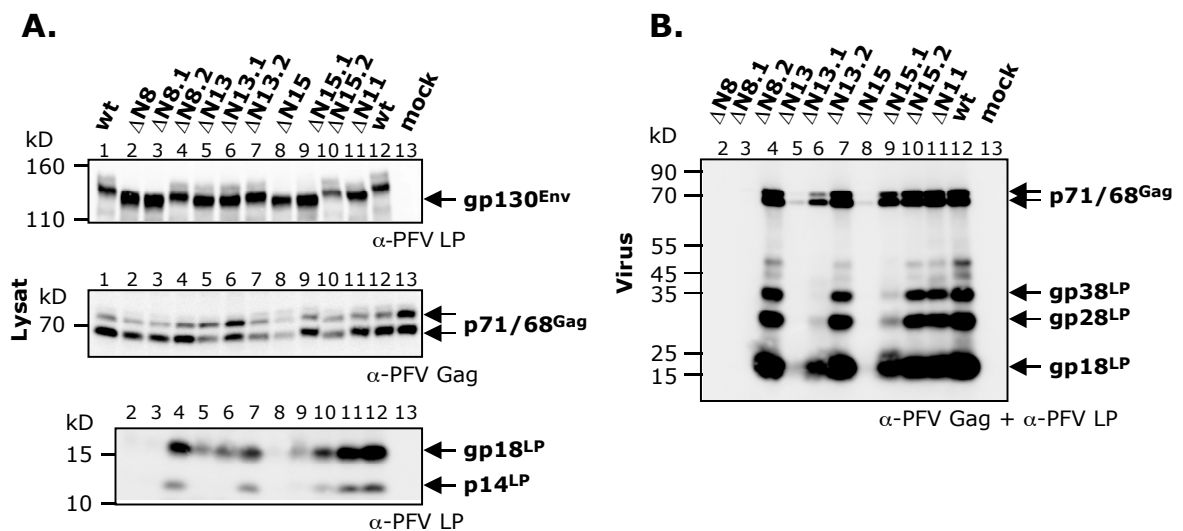


Abbildung 15: Biochemische Analyse der NGS-Mutanten

Western Blot Analyse transfizierter 293T Zellen (Lysat) und aufgereinigten PFV-haltigen Zellkulturüberständen (Virus). Die Zellen wurden mit Ca_2PO_4 nach der Standardmethode transfiziert. Nach 48h p.T. wurden Zelllysate und Überstände gewonnen. Viruspartikel wurden über 20% Sucrose aufgereinigt. Alle Env-Expressionsplasmide wurden mit dem PFV Vektor pMH118 kotransfiziert. **(A):** Lysate transfizierter Zellen detektiert mit Anti-PFV LP 1-86 (polyklonales Hasenserum) und Anti-PFV Gag SGG1 (Hybridomaüberstand), **(B):** Aufgereinigte Viruspartikel detektiert mit Anti-PFV LP 1-86 (polyklonales Hasenserum) und Anti-PFV Gag SGG1 (Hybridomaüberstand), ΔN8.1: pczHFVenvEM131, ΔN8.2: pczHFVenvEM151, ΔN13.1: pczHFVenvEM132, ΔN13.2: pczHFVenvEM152, ΔN15.1: pczHFVenvEM133, ΔN15.2: pczHFVenvEM153, ΔN11: pczHFVenvEM112, wt: pczHFVenvEM002, mock: pMH118 + pcDNA3.1zeo.

In Abb.15A (Spur 1-13) kann man an den Banden des Vorläuferproteins (gp130^{Env}) eine vergleichbare zelluläre Expression aller Mutanten sehen. Darüber hinaus ist der Größenunterschied zwischen den glykosylierten und den nicht-glykosylierten Proteinen klar zu erkennen. Am Beispiel der achten NGS-Mutante sieht man in den Spur 2 und 3 die Banden deutlich schneller laufen als in den Banden 1 und 4. Das weist auf eine fehlende

Glykosylierung der Mutanten hin, bei welchen die erste bzw. dritte Aminosäure des N-X-S/T Motivs ersetzt wurden. Das Vorläuferprotein der Δ N8.2 Mutante (Abb.15A, Spur 4) läuft dagegen auf gleicher Höhe wie die Bande des Wildtyps (Abb.15A, Spur 1), was den Schluß zu lässt, dass an dieser Stelle durch die Mutation die N-Glykosylierung nicht beeinträchtigt wurde und das Protein ein wildtypisches Glykosylierungsmuster hat. Dieser Befund gilt analog auch für die entsprechenden Mutanten der dreizehnten und fünfzehnten NGS (Abb.15A Spur 7, 10). Das LP Prozessierungsmuster zeigt also bei den Mutanten Δ N8.1 und Δ N13.1 (Abb.15A, Spur 3, 6) keinen Unterschied zu den dazugehörigen Δ N8 und Δ N13 Mutanten (Abb.15A, Spur 2, 5). Bei der Mutante Δ N15.1 hingegen ist im Vergleich zur ursprünglichen Δ N15 Mutante eine leichte Erhöhung der Prozessierungsrate zu beobachten (Abb.15A, Spur 8, 9). Die LP Banden der Mutanten Δ N8.2, Δ N13.2 und Δ N15.2 hingegen waren vergleichbar intensiv wie die des Wildtyps und der Δ N11 Mutante (Abb.15A, Spur 4, 7, 10, 11, 12).

Die Partikelfreisetzung der Mutanten Δ N8.2, Δ N13.2 und Δ N15.2 ist nicht von der Freisetzung des Wildtyps und der Δ N11 Mutante (Abb.15B, Spur 4, 7, 10, 11, 12) zu unterscheiden, was gut mit den Intensitäten der Env Prozessierungsbanden in den Zelllysaten korreliert. Die Mutanten Δ N8 und Δ N8.1 zeigen keinerlei detektierbare Partikelfreisetzung (Abb.15B, Spur 2, 3), wohingegen die Δ N13.1 eine stärkere Freisetzung zeigt als die Δ N13 Mutante (Abb.15B, Spur 5, 6), die ihrerseits eine stark reduzierte Freisetzung aufweist. Dieser Befund gilt auch für die Δ N15.1 Mutante (Abb.15B, Spur 9), bei welcher im Gegensatz zur Δ N15 (Abb.15B, Spur 8) eine klare Freisetzung von PFV Partikeln nachweisbar ist. Diese Unterschiede in der Partikelfreisetzung können direkt auf den Einfluß der mutierten Env-Proteine zurückgeführt werden, da die zelluläre Gag Expression für alle Mutanten auf annähernd gleichem Niveau ist (Abb.15A, Spur 1-13). Interessanterweise kann man für die Mutanten Δ N13.1 und Δ N15.1 eine im Vergleich zu den dazugehörigen Mutanten Δ N13 und Δ N15 erhöhte Partikelfreisetzung erkennen, obgleich bei jenen Mutanten die N-Glykosylierung genauso fehlt, was an den schneller laufenden Vorläuferbanden gut zu erkennen ist.

Zusammengefasst zeigen diese Analysen, dass ein konservativer Aminosäureaustausch an den Positionen 1 und 3 der NGS-Sequenz zu einer Blockade der Glykosylierung führt. Eine Mutation der mittleren, nicht essentiellen Aminosäure, verhindert die Glykosylierung dagegen nicht. Diese Mutanten zeigen einen dem wildtypischen PFV Env ähnlichen Phänotyp. Eine fehlende Glykosylierung an den Positionen 8, 13 und 15 hingegen bewirkt einen Transport- und Prozessierungsdefekt, wodurch eine Freisetzung viraler Partikel unterbleibt.

3.1.4 Infektionsanalysen

3.1.4.1 Analyse der Infektiosität mittels Durchflusszytometrie (FACS)

Mutationen einiger N-Glykosylierungsmotive haben einen starken Einfluß auf den Transport, die Prozessierung und die virale Partikelfreisetzung der Hüllproteinmutanten. So konnte gezeigt werden dass ein Verlust der achten NGS durch Mutation zu einem massiven Verlust an Prozessierung und Freisetzung der betreffenden Mutanten führt. Dies gilt auch für die Mutanten der dreizehnten und fünfzehnten NGS, nur in weniger starker Ausprägung. Für

manche dieser NGS-Mutanten konnte noch eine gewisse Freisetzung von Viruspartikeln durch Western Blot Analysen gezeigt werden. Ob dies aber defekte Viruspartikel sind, also solche die nicht mehr zu einer produktiven Infektion in der Lage sind, oder infektiöse Viren, wurde durch einen Markergentransfer (Kap. 2.5.4) mit anschließender FACS Analyse (Kap. 2.4.6) der infizierten Zellen bestimmt.

Dazu wurden die Hüllproteinmutanten zusammen mit einem PFV Vektor, der eine eGFP-Markergenkassette enthält, in 293T Zellen kotransfiziert (Kap. 2.4.3.2). Diese wurden induziert (Kap. 2.4.4) und die Überstände 48h nach Transfektion abgenommen und für eine Infektion aufbereitet (Kap. 2.5.2), welche auf HT1080 Zellen für ca. 6h erfolgte. Danach wurde die Infektion beendet und die Zellen weitere 48h in einem Brutschrank inkubiert (Kap. 2.5.4).

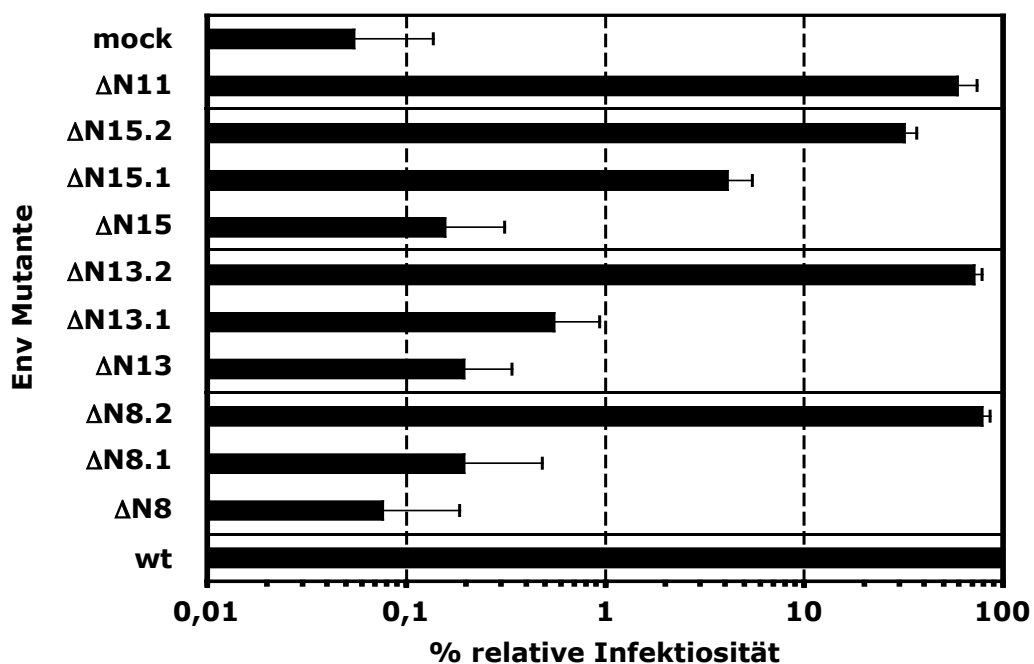


Abbildung 16: Infektionsanalyse ausgewählter NGS-Mutanten

FACS Analyse infizierter HT1080 Zellen. 293T Zellen wurden Ca_2PO_4 transfiziert und die Überstände 48h p.T gewonnen. Die Infektion erfolgte für 6h, die FACS Analyse 48h nach Infektion. Alle Env-Mutanten wurden mit einem PFV Vektor kotransfiziert, der eine eGFP-Reporterkassette enthält. Die Werte des Wildtyps wurden in einem relativen Bezugssystem auf 100% gesetzt (n=4). wt: pczHFVenvEM002, ΔN8: pczHFVenvEM109, ΔN8.1: pczHFVenvEM131, ΔN8.2: pczHFVenvEM151, ΔN13: pczHFVenvEM114, ΔN13.1: pczHFVenvEM132, ΔN13.2: pczHFVenvEM152, ΔN15: pczHFVenvEM116, ΔN15.1: pczHFVenvEM133, ΔN15.2: pczHFVenvEM153, ΔN11: pczHFVenvEM112, mock: pcDNA3.1zeo + pMH118.

Wie in vorangegangenen Versuchen (Abb.11) bereits nachgewiesen ist die Mutante ΔN8 nicht mehr infektiös (Abb.16). Dies gilt auch für die ΔN8.1 Mutante, da beide nicht wesentlich über dem Signal der Negativkontrolle (mock) liegen. Die ΔN13.1 Mutante ist ungefähr 4fach infektiöser als die Mutante ΔN13, die ihrerseits nur knapp über dem Detektionslimit liegt. Die ΔN15.1 Mutante ist ca. 30fach infektiöser als die zugehörige ΔN15 Mutante, liegt dennoch bei nur ca. 4% im Vergleich zum Wildtyp. Die Mutanten mit dem konservativen Austausch der mittleren Aminosäure zeigen einen dramatischen Anstieg ihrer Infektionseffizienzen, der im Fall der Mutanten ΔN8.2 und ΔN13.2 zwischen 70% und 80% des Wildtyps liegt. Die

Mutante $\Delta N15.2$ liegt mit ca. 40% Infektiosität, verglichen mit dem Wildtyp, deutlich darunter. Die Infektionsdaten korrelieren gut mit den aus den Partikelpräparationen gewonnenen Daten. Unabhängig davon um welche NGS es sich handelt, zeigen die Mutanten mit der N->Q Mutation (erste Aminosäure) den stärksten Phänotyp. Das kann an der fehlenden Glykosylierung, aber möglicherweise auch durch die Einführung einer vom Wildtyp abweichenden Aminosäure innerhalb des Motivs liegen. Die Mutanten mit den S->V, bzw. T->A Mutationen der dritten Aminosäure weisen eine schwächere Ausprägung des Phänotyps auf. Die dritte Aminosäure in dem Motiv wird selber nicht glykosyliert, ist aber essentiell für die Bildung der Erkennungssequenz. Der Austausch der mittleren Aminosäure (T->V, S->V, E->Q) hingegen hat keinen wesentlichen Einfluß. Weder auf die Partikelfreisetzung noch auf die Infektiosität.

3.1.4.2 LacZ-Titration

Die Infektionsanalysen mittels eGFP-Markergentransfer zeigten, dass die Inaktivierung der achten, dreizehnten und fünfzehnten NGS die Freisetzung infektiöser Viruspartikel nahezu komplett unterdrückt. Zur Bestätigung dieser Befunde wurden diese Mutanten nochmals in einem anderen Analyseverfahren auf ihre Infektiosität hin untersucht, welches deutlich sensitiver als eine FACS Analyse ist und einen größeren dynamischen Bereich besitzt. Auch bei einer so genannten LacZ-Titration werden die Hüllproteinmutanten zusammen mit einem PFV Vektor kotransfiziert und Zielzellen infiziert. Nur trägt der Vektor in diesem Fall kein eGFP als Markergen, sondern LacZ. Bei diesem Versuch werden Virussuspensionen in 10fachen Schritten verdünnt bis zu einer Endverdünnung von 10^{-6} . Mit diesen so verdünnten Überständen werden Zielzellen infiziert. Der Vorteil dieser Methode ist, dass in der geeigneten Verdünnungsstufe jedes einzelne Infektionsereignis als solches durch eine Blaufärbung der infizierten Zelle identifiziert werden kann (iE/ml: infektiöse Einheiten/ml Überstand). Die Fehlerrate ist dadurch bei gewissenhaftem Auswerten gering.

Die Hüllproteinmutanten wurden mit einem LacZ-tragendem PFV Vektor kotransfiziert (Kap. 2.4.3.2) und induziert (Kap. 2.4.4). Die Ernte und Aufbereitung der virushaltigen Überstände erfolgte gemäß dem Kapitel 2.5.2. Die so gewonnenen Überstände wurden mit D-MEM komplett in Stufen, die jeweils eine Zehnerpotenz beinhalteten, verdünnt. So erhielt man 7 Verdünnungen pro Mutante bis zu einer Endkonzentration von 10^{-6} . Vorbereitete HT1080 Zellen wurden für 6h infiziert und nach Beendigung der Infektion für weitere zwei Tage inkubiert. Die LacZ-Färbung erfolgte nach Protokoll (Kap. 2.4.7).

Wie schon in der FACS Analyse, zeigt die $\Delta N8$ Mutante keinerlei Infektionsereignisse, die über dem Wert der Negativkontrolle liegen (Abb.17). Die Mutante $\Delta N13$ ist in diesem Nachweisverfahren um den Faktor 700 weniger infektiös, aber dennoch klar über dem Nullwert der Negativkontrolle. Das Gleiche gilt auch für die $\Delta N15$ Mutante, die eine um den Faktor 950 erniedrigte Infektiosität im Vergleich zu Wildtyp zeigt. Die Mutante $\Delta N11$ liegt im Bereich des Wildtyps und ist um den Faktor 2,5 erniedrigt. In absoluten Zahlen enthielt 1ml viraler Überstand des Wildtyps, im Mittel aus drei voneinander unabhängigen Versuchen, $2,24 \times 10^5$ iE.

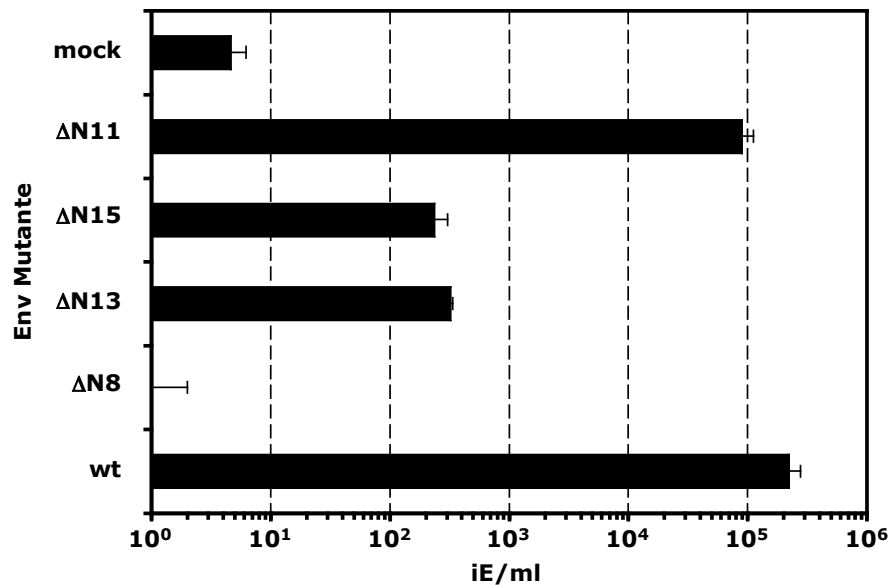


Abbildung 17: LacZ-Titration ausgewählter NGS-Mutanten

LacZ-Infektionsanalyse infizierter HT1080 Zellen. 293T Zellen wurden Ca_2PO_4 transfiziert und die Überstände 48h p.T gewonnen. Die Infektion erfolgte für 6h, die LacZ-Färbung 48h nach Infektion. Alle Env-Mutanten wurden mit einem PFV Vektor kotransfiziert, der eine LacZ-Reporterkassette enthält. Die absoluten Werte sind in infektiösen Einheiten pro ml Virussuspension angegeben (n=3). wt: pczHFVenvEM002, ΔN8: pczHFVenvEM109, ΔN13: pczHFVenvEM114, ΔN15: pczHFVenvEM116, ΔN11: pczHFVenvEM112, mock: pcDNA3.1zeo + pMH120.

Auch mit der sensitiveren Methode der LacZ-Titration werden die bereits bekannten Phänotypen bestätigt.

3.1.5 Temperatursensitivitätstest

Für eine Reihe von Viren, z.B. Herpesviren (Chiu et al., 2005) oder MuLV (Felkner und Roth, 1992), wurden bereits temperatursensitive Mutanten beschrieben. Darunter versteht man, dass bestimmte Mutationen zum Funktionsverlust bei einer physiologischen Temperatur von 37°C führen. Erniedrigt man aber die Temperatur beispielsweise auf 30°C, zeigen diese Mutanten erneut eine partielle, oder eine dem Wildtyp bei physiologischer Temperatur entsprechende Funktion.

Vorversuche haben ergeben, dass sich die Mutanten ΔN8.2, ΔN13.2 und ΔN15.2 bezüglich ihres Glykosylierungsmusters, der Partikelfreisetzung und Infektiosität entsprechend dem Wildtyp verhalten, und sind aus diesem Grund nicht in die folgenden Versuche mit übernommen worden.

Für den Temperatursensitivitätstest (Kap. 2.5.5) wurden 293T Zellen Ca_2PO_4 transfiziert (Kap. 2.4.3.1). Die Induktion mit Na-Butyrat (Kap. 2.4.4) erfolgte für 6h entweder bei 30°C oder 37°C. Die Zellen bei 30°C wurden nach Beendigung der Induktion bei 30°C belassen und über Nacht inkubiert. Die Infektion (Kap. 2.5.5) erfolgte (48h p.T.) für 6-8h bei 30°C. Danach wurden die Zellen für zwei weitere Tage bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert. Es folgte eine FACS Analyse (Kap. 2.4.6).

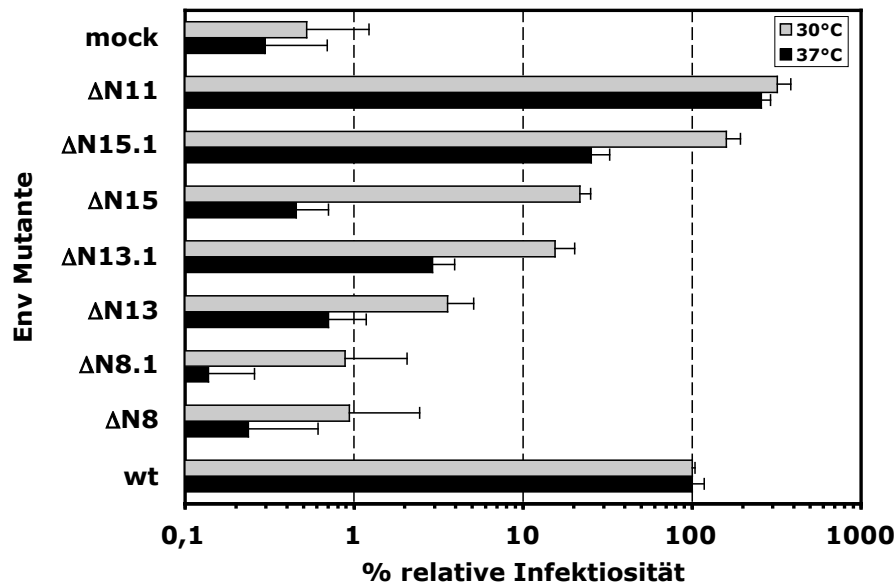


Abbildung 18: Temperatursensitivitätstest ausgewählter NGS-Mutanten

FACS Analyse infizierter HT1080 Zellen. 293T Zellen wurden Ca_2PO_4 transfiziert. Induktion und Infektion erfolgte bei 37°C (schwarze Balken), oder bei 30°C (graue Balken). Die FACS-Analyse erfolgte 48h p.T. Alle Env-Mutanten wurden mit einem PFV Vektor kotransfiziert, der eine eGFP-Reporterkassette enthält. Die Werte des Wildtyps wurden in einem relativen Bezugssystem auf 100% gesetzt (n=4). wt: pczHFVenvEM002, ΔN8: pczHFVenvEM109, ΔN8.1: pczHFVenvEM131, ΔN13: pczHFVenvEM114, ΔN13.1: pczHFVenvEM132, ΔN15: pczHFVenvEM116, ΔN13.1: pczHFVenvEM133, ΔN11: pczHFVenvEM112, mock: pcDNA3.1zeo + pMH118.

Generell stieg die relative Infektiosität der untersuchten Mutanten, mit Ausnahme der ΔN11 Mutante, bei 30°C im Vergleich zu der bei 37°C um den Faktor 2 bis 5 an (Abb.18). Die Erniedrigung der Temperatur ergab für die Mutanten der 8. NGS jedoch keine neuen Phänotypen (Abb.18). Man konnte zwar eine Erhöhung der FACS-positiven Zellen nachweisen, dies gilt aber auch für die Negativkontrolle. Das die mock-Kontrollen anstiegen liegt in der Kombination aus Eigenfluoreszenz und den generell gesunkenen Virustitern begründet. Die bei 30°C inkubierten Zellen zeigten eine erhöhte Granularität und wiesen optisch eine andere Morphologie auf. Für die Mutanten ΔN13 und ΔN13.1 hingegen konnte eine ca. 5fache Steigerung ihrer relativen Infektiosität bei 30°C gegenüber 37°C nachgewiesen werden. Die ΔN13 Mutante, die bei 37°C nur knapp über der Nachweisgrenze liegt, liegt bei 30°C bei ca. 3% des Wildtyps. Ähnliches gilt für die ΔN13.1 Mutante, die in ihrer Infektiosität von unter 3% auf über 15% im Vergleich zum Wildtyp ansteigt. Den stärksten Phänotyp jedoch zeigt die ΔN15 Mutante. Liegt sie bei 37°C nur knapp oberhalb der Nachweisgrenze, steigt sie bei 30°C um den Faktor 50 in ihrer Infektiosität auf über 20% des Wildtyps an. Die ΔN15.1 Mutante zeigt im Gegensatz zur ΔN15 nur einen moderaten ca. 5fachen Anstieg auf Wildtypniveau.

Es handelt sich hierbei um relative Werte, die sich auf die Infektiosität des Wildtyps beziehen. Betrachtet man aber die tatsächlichen Titer, erkennt man, dass vor allem der Wert für den Wildtyp bei 30°C stark abfällt. Die absoluten Titer der Mutanten dagegen sinken nur mäßig, oder steigen wie im Fall der Mutanten ΔN15 und ΔN15.1 sogar an.

Von einem deutlich temperatursensitiven Phänotyp kann man daher nur bei der Mutante ΔN15 sprechen, deren Infektionseffizienz bei 30°C um den Faktor 50 auf 20% des Wildtypniveaus steigt.

3.2 Ubiquitin als Regulator der PFV Partikelfreisetzung

Die bisherigen Analysen zeigten, dass mit einem LP-spezifischen Antiserum mehrere Proteinbanden mit Molekulargewichten zwischen 18 und 38kDa im Immunoblot von FV Partikellysaten detektiert werden konnten. Noch ungeklärt jedoch war die Frage, ob es sich bei diesen Proteinen um alternative Prozessierungsprodukte des Vorläuferproteins oder um unterschiedlich modifizierte Varianten eines Prozessierungsproduktes handelte. Die Möglichkeit alternativer Prozessierungsprodukte jedoch konnte von Duda und Kollegen (Duda et al., 2004) durch eine Proteinsequenzierung des N-Terminus der SU Untereinheit weitestgehend ausgeschlossen werden. Deshalb wurden Untersuchungen vorgenommen, um herauszufinden, ob alternative posttranslationale Modifikationen nachweisbar sind. Hierzu wurden zunächst aufgereinigte PFV Partikel einem Glykosidaseverdau unterzogen (Abb.19).

Glykosidasen spalten typenspezifisch Zuckergruppen von Proteinen. PNGaseF (Protein:N-Glykosidase F) besitzt eine breite Spezifität und kann jede N-glykosidische Kohlenhydratgruppe schneiden. Dabei schneidet es direkt am Asparagin, so dass keine weiteren Zucker zurückbleiben. EndoH (Endoglykosidase H) hingegen schneidet nur hybride Kohlenhydratgruppen und Zucker des High-Mannose Typs. Darüberhinaus werden die Kohlenhydratgruppen nicht direkt am Protein geschnitten, sondern es bleibt ein N-Acetylglucosaminrest am Asparagin gebunden.

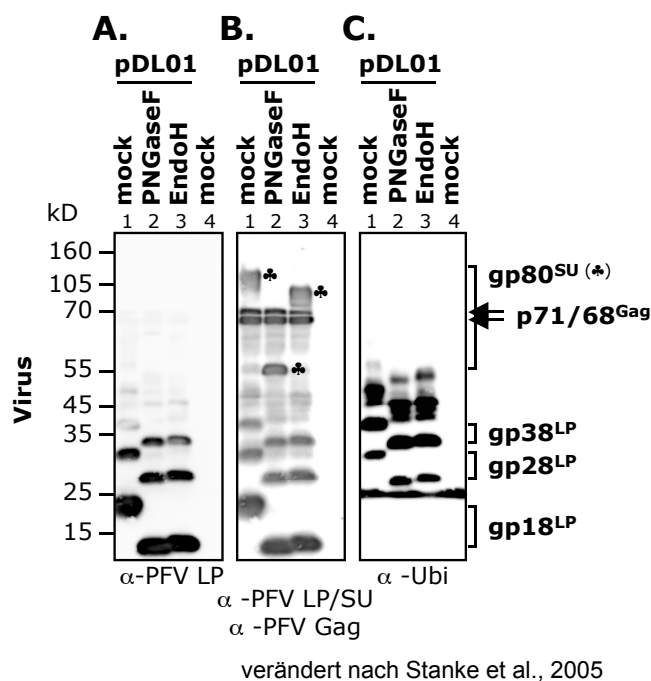


Abbildung 19: Glykosidaseverdau von PFV Partikeln

PFV Partikel wurden durch Transfektion von 293T Zellen mit dem replikationsdefizienten proviralen PFV Vektor pDL01 (Spur 1-3) gewonnen. Partikel wurden über 20% Sucrose in einer Ultrazentrifuge aufgereinigt. Partikel wurden mit Glykosidasen verdaut. Die Detektion erfolgte mit (A) Anti-PFV LP 1-86 (polyklonales Hasenserum), (B) Anti-PFV LP/SU 87-148 + Anti-Gag (polyklonale Hasenserum) und (C) Anti-Ubi P4D1 (monoklonaler Antikörper). (*): SU Varianten mit verschiedenem Glykosylierungsgrad.

Der Versuch wurde durchgeführt und veröffentlicht von Stanke et al., J.Virol. **79**: 15074-15083, 2005.

In Abbildung 19A sieht man das Ergebnis eines Glykosidase-Verdaus von PFV Partikeln (Stanke et al., 2005). In den Spur 2 und 3 kann man die nach dem Verdau deutlich niedriger laufenden LP Banden im Vergleich zur unbehandelten Probe (mock) erkennen. Dies ist dem Verlust der Kohlenhydratgruppen geschuldet. Auch ist deutlich zu erkennen, dass die Banden der PNGaseF behandelten Proben ein kleines Stück niedriger laufen als die aus der EndoH Behandlung. Das liegt an der Eigenschaft, dass PNGaseF im Gegensatz zu EndoH

die Zuckerketten restlos von den Zielproteinen entfernt. Alle N-Glykosylierungen in der LP Untereinheit von Foamyviren sind folglich sowohl PNGaseF als auch EndoH sensitiv. Im Gegensatz dazu trägt die SU Untereinheit (Abb.19B, mit ♣ markiert) Kohlenhydratketten, die nicht EndoH sensitiv sind, erkennbar an den deutlich tiefer laufenden SU Banden in der PNGaseF- im Vergleich zur EndoH-behandelten Probe (Abb.19B, Spur 2, 3). Die höher molekularen LP Formen sind mit einem LP spezifischen Antikörper auch nach dem Glykosidase Verdau gut zu erkennen und zeigen das gleiche veränderte Laufverhalten wie die dazugehörige gp18^{LP} Bande. Damit konnte abschließend geklärt werden, dass es sich nicht um N-glykosidische Modifikationen handelt. Die Gag Banden hingegen sind nicht durch die Behandlung mit den Glykosidasen beeinträchtigt und zeigen kein verändertes Laufverhalten (Abb.19B, Spur 1-3).

Eine weitere posttranslationale Modifikation von Proteinen neben der Glykosylierung ist die Ubiquitinierung. Mit einem Ubiquitin-spezifischen, monoklonalen Antikörper konnte bei den Proben das gp18^{LP} nicht nachgewiesen werden, aber die höher molekularen Formen gp28^{LP} und gp38^{LP} (Abb.19C, Spur 1-3). Dies deutet daraufhin, dass es sich bei den alternativen LP Isoformen nicht um alternativ glykosylierte Varianten handelt, sondern um ubiquitinierte. Diese Annahme wird noch durch die Tatsache unterstützt, dass die alternativen Banden ca. 10kD schwerer zu sein scheinen, bei einem theoretischen Molekulargewicht für Ubiquitin von 8,5kD.

Ubiquitin wird an Lysine angehängt, und die N-terminale zytoplasmatische Domäne des foamyviralen Leaderpeptids trägt fünf davon. Ein konservativer Aminosäureaustausch der ersten drei Lysine zu Arginin (K->R) führte zu einer deutlich schwächeren Ubiquitinierung, und nach einer Inaktivierung aller fünf Lysine konnte gar keine mehr nachgewiesen werden (Stanke et al., 2005). Tauschte man allerdings nur einzelne Lysine durch Arginin aus, konnten keine auffälligen Unterschiede in den Banden im Vergleich zum wildtypischen PFV Env ausgemacht werden. Auch die Transmembran Untereinheit beherbergt vier Lysine in ihrer CyD, die aber nicht ubiquitiniert werden (Stanke et al., 2005). In Infektionsversuchen erzielte die Mutante, welche alle 5 Lysine des Leaderpeptids durch Arginine ersetzt hatte (Δ Ubi 1-5) eine 2-3fach höhere Infektiosität, wenn sie mit einem PFV Vektor kotransfiziert wurde. Im proviralen Kontext besitzt sie dagegen keine erhöhte Infektiosität.

Der interessanteste Befund jedoch ist die Tatsache, dass diese Ubiquitin-Mutanten eine massive Freisetzung subviraler Partikel zeigen. Für die Mutante Δ Ubi1-5 gilt dies in höherem Maße als für die Mutante Δ Ubi1-3, bei welcher die ersten drei Lysine ausgetauscht wurden. Das steht in einem krassen Gegensatz zum wildtypischen PFV Env, bei welchem unter nicht aufkonzentrierten Bedingungen fast keine SVP Sekretion nachzuweisen ist (Shaw et al., 2003; Stanke et al., 2005).

Diese Befunde haben gezeigt, dass Ubiquitin eine wichtige Rolle bei der Regulation der Freisetzung foamyviraler Partikel und SVP hat. Aber nicht nur die bloße Anwesenheit von Ubiquitin ist wichtig, sondern die Verteilung und Anzahl der potentiellen Ubiquitinierungsstellen scheinen einen graduellen Einfluß auf die Sekretion auszuüben.

Dieser Einfluß auf die Freisetzung viraler und subviraler Partikel sollte im Folgenden genauer untersucht werden. Zum einen durch die Herstellung von PFV Env/Ubiquitin Fusionsproteinen, sowie durch Revertanten die im Kontext der Δ Ubi 1-5 Mutante einzelne Lysine wiedereingeführt haben.

3.2.1 Klonierung und biochemische Analyse der Env/Ubi-Fusionsproteine

Ubiquitin besitzt eine intrinsische Endozytoseaktivität. Das heißt, dass Ubiquitin in seiner Aminosäuresequenz ein Signal für die Aufnahme in Zellen über Endozytose trägt (Shih et al., 2000). In einer Studie ist beschrieben worden, dass eine Fusion von Ubiquitin an einen stabil auf der Zelloberfläche exprimierten Rezeptor, dessen Halbwertszeit in der Plasmamembran um den Faktor 4 verringert. Das Internalisierungssignal des Proteins kann dabei in seiner Funktion komplett durch Ubiquitin ersetzt werden (Shih et al., 2000).

Der Annahme folgend, dass bei der Δ Ubi 1-5 Mutante der intrazelluläre Transport und die Expression in zellulären Membranen durch die fehlende Ubiquitinierung gestört ist, wurden Env/Ubi-Fusionsproteine hergestellt. Hierfür wurde Ubiquitin im gleichen Leseraster wie die PFV Env Δ Ubi 1-5 Mutante an eben diese fusioniert. Die endständigen, C-terminalen Glyzine des Ubiquitins wurden deletiert, da sie als Erkennungssequenz für spezifische Ubiquitin Hydrolasen dienen (Gilchrist et al., 1997; Shih et al., 2000). Damit sollte eine Abspaltung des Ubiquitins vom Fusionsprotein verhindert werden.

3.2.1.1 Klonierung von Env/Ubi-Fusionsproteinen

Alle Klonierungen basieren auf dem pczHFVenvEM140 (Δ Ubi 1-5) Env-Expressionsplasmid, welches seinerseits auf dem wildtypischen pczHFVenvEM002 basiert (Abb.14).

Die gewonnenen DNA Fragmente wurden über präparative Agarosegelelektrophorese (Kap. 2.3.4) aufgetrennt und mit dem Geneclean Turbo Kit (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die fertigen Expressionsplasmide wurden durch Sequenzierung auf ihre Richtigkeit geprüft.

pczHFVenvEM154 (C-Ubi 1)

Fragment	Vorlage	Primer	Enzyme	Länge [bp]
Vektor	pczHFVenvEM140		NheI / EcoRI / CIAP	733
1.Insert	pczHFVenvEM140	391 / 2291	NheI / BamHI	214
2.Insert (a)	pBJ5SR α Ubi	2292 / 2294		250
2.Insert (b)	(a)	2293 / 2294	BamHI / EcoRI	278

pczHFVenvEM155 (N-Ubi 1)

Fragment	Vorlage	Primer	Enzyme	Länge [bp]
Vektor	pczHFVenvEM140		BsmBI / Kpn2I / CIAP	7489
1.Insert (a)	pBJ5SR α Ubi	2287 / 2288		266
1.Insert (b)	(a)	2287 / 2289	BsmBI / BamHI	283
2.Insert	pczHFVenvEM140	2290 / 312	BamHI / Kpn2I	464

pczHFVenvEM156 (N-Ubi 2)

Fragment	Vorlage	Primer	Enzyme	Länge [bp]
Vektor	pczHFVenvEM155		Kpn2I / BsmBI / CIAP	7491
1.Insert	pczHFVenvEM155	487 / 2347	BglII / BsmBI	330
2.Insert	pczHFVenvEM155		Kpn2I / BglII	502

pczHFVenvEM157 (N-Ubi 3)

Fragment	Vorlage	Primer	Enzyme	Länge [bp]
Vektor	pczHFVenvEM155		Kpn2I / BsmBI / CIAP	7491
1.Insert	pczHFVenvEM155	487 / 2348	BglII / BsmBI	310
2.Insert	pczHFVenvEM155		Kpn2I / BglII	502

pczHFVenvEM158 (C-Ubi 2)

Fragment	Vorlage	Primer	Enzyme	Länge [bp]
Vektor	pczHFVenvEM154		NheI / EcoRI / CIAP	7729
Insert	pczHFVenvEM154	830 / 2349	NheI / EcoRI	500

pczHFVenvEM159 (N/C-Ubi)

Fragment	Vorlage	Primer	Enzyme	Länge [bp]
Vektor	pczHFVenvEM156		NheI / XhoI / CIAP	7993
Insert	pczHFVenvEM154		NheI / XhoI	521

In Abbildung 20 sind die Konstrukte schematisch dargestellt. Ein Glyzin/Serin-Linker wurde eingesetzt um einer Beeinträchtigung der Funktion der einzelnen Proteine durch die Fusion entgegenzuwirken. Die Linker ermöglichen eine flexible Bewegung der jeweiligen Domänen, unabhängig von der Konformation des Fusionspartners.

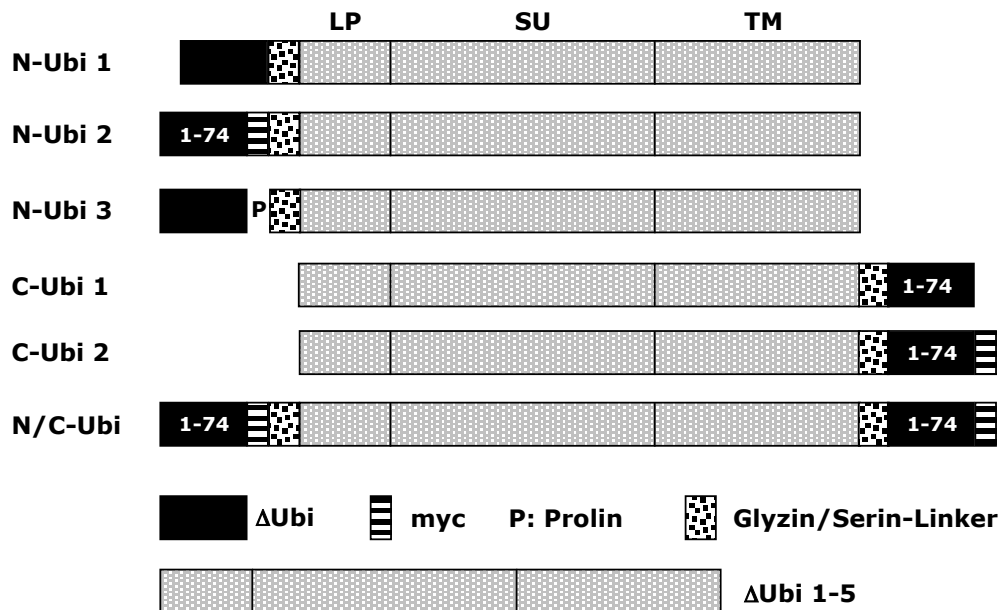


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Env/Ubi Fusionskonstrukte

Übersicht über die Fusionskonstrukte mit den jeweiligen Domänen. C-Ubi 1: pczHFVenvEM154, N-Ubi 1: pczHFVenvEM155, N-Ubi 2: pczHFVenvEM156, N-Ubi 3: pczHFVenvEM157, C-Ubi 2: pczHFVenvEM158, N/C-Ubi: pczHFVenvEM159.

Ein myc-tag wurde zwischen das Ubiquitin und den Glyzin/Serin-Linker eingebracht um die Erkennung durch spezifische Ubiquitin Hydrolasen zu verhindern. Diese erkennen endständige Glyzine, die bei der Δ Ubi 1-74 Variante zwar fehlen, aber durch den Glyzin/Serin-Linker wieder ersetzt würden. Um dieser Eigenschaft auch Rechnung zu tragen wurde bei der Mutante N-Ubi 3 zwischen das Ubiquitin und den Glyzin/Serin-Linker ein Prolin eingeführt. Für Prolin ist beschrieben worden, dass es die Spaltung nach dem Ubiquitin um den Faktor 20 verringert. Vermutlich aufgrund der Eigenschaft, dass Prolin wegen seiner aromatischen Seitenkette am Stickstoff kein freies Proton mehr trägt. Dieses Proton wird benötigt um die Spaltung durch spezifische Hydrolasen zu katalysieren (Gonda et al., 1989).

3.2.1.2 Biochemische Analyse

Um die biochemischen Eigenschaften der Env/Ubi-Fusionsproteine zu untersuchen, wurden die Expressionskonstrukte in 293T Zellen transfiziert und Überstände gewonnen. Da es sich bei diesen Konstrukten um Varianten der Δ Ubi 1-5 Mutante handelt, die eine massive Freisetzung subviraler Partikel zeigt, wurden bei diesen Versuchen die Env Proteine ohne einen PFV Gag/Pol Vektor transfiziert, damit man eine Auswirkung auf den Δ Ubi 1-5 Phänotyp leichter als solchen erkennen kann.

Dazu wurden 293T Zellen mit PEI transfiziert (Kap. 2.4.3.2) und mit Na-Butyrat induziert. Die Zelllyse (Kap. 2.4.4) fand 48h nach der Transfektion statt, ebenso wie die Ernte der Zellkulturüberstände (Kap. 2.5.2). Diese wurden wie in dem Kapitel 2.5.6 beschrieben mittels Ultrazentrifugation aufgereinigt und in Probenpuffer aufgenommen. Die gewonnenen Proben wurden über eine Trizin-SDS-Gelelektrophorese (Kap. 2.6.1) aufgetrennt und es folgte eine Western Blot Analyse (Kap. 2.6.2 und 2.6.4).

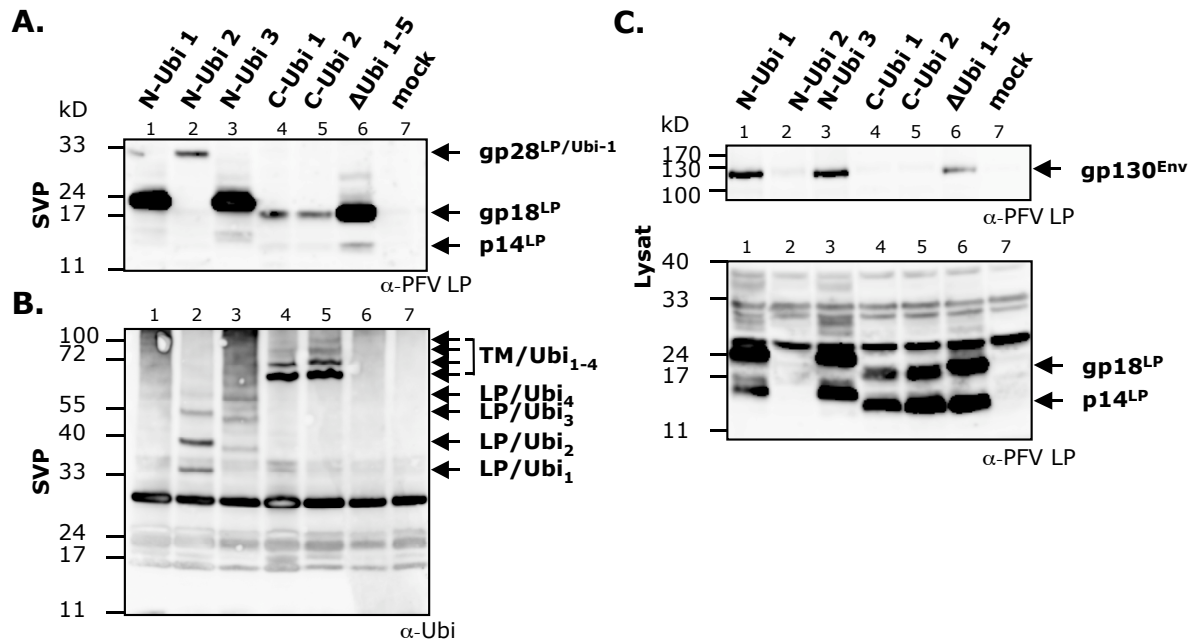


Abbildung 21: Biochemische Analyse der Env/Ubi Fusionsproteine

Western Blot Analyse transfizierter 293T Zellen (Lysat) und SVP haltiger Zellkulturüberstände (SVP). Subvirale Partikel wurden durch PEI Transfektion von 293T Zellen mit den entsprechenden Env/Ubi Expressionsplasmiden gewonnen. SVP wurden 48h p.T. über 20% Sucrose in einer Ultrazentrifuge aufgereinigt. Die Detektion erfolgte mit **(A)** Anti-PFV LP 1-86 (polyklonales Hasenserum), **(B)** Anti-Ubiquitin P4D1 (monoklonaler Antikörper) und **(C)** Anti-PFV LP 1-86 (polyklonales Hasenserum). N-Ubi 1: pczHFVenvEM155, N-Ubi 2: pczHFVenvEM156, N-Ubi 3: pczHFVenvEM157, C-Ubi 1: pczHFVenvEM154, C-Ubi 2: pczHFVenvEM158, mock: pcDNA3.1zeo.

Die Ergebnisse des immunologischen Nachweises der Proteine sind in Abbildung 21 zu sehen. An den LP Banden der Mutanten N-Ubi 1 und N-Ubi 3 kann man erkennen, dass das fusionierte Ubiquitin abgespalten wurde (Abb.21A, Spur 1, 3). Bei beiden Mutanten hat es sich um ein Ubiquitin gehandelt, welches noch die endständigen Glyzine G₇₅ und G₇₆, also das Prozessierungssignal, trägt. Die Banden laufen ein wenig höher als die der ΔUbi 1-5 Mutante, was an dem Glyzin/Serin-Linker liegt, der noch am LP verblieben ist. Das Prolin zwischen dem Ubiquitin und dem LP hat eine Prozessierung nicht verhindern oder merklich herabsetzen können (Abb.21A, Spur 3). Bei der Mutante N-Ubi 2 hingegen ist das Ubiquitin nicht abgespalten worden (Abb.21A, Spur 2). Hierbei handelt es sich um ein Ubiquitin ohne die letzten beiden Glyzine. Darüber hinaus ist zwischen dem Ubiquitin und dem Glyzin/Serin-Linker ein myc-tag, welcher effizient eine Spaltung des Fusionsproteins verhindert hat. Die Leaderpeptide der drei Mutanten C-Ubi 1, C-Ubi 2 und ΔUbi 1-5 (Abb.21A, Spur 4-6) laufen auf vergleichbaren Höhen, wenngleich mit Unterschieden in ihrer Intensität. Die Vorläuferproteine der Fusionsmutanten waren in allen Versuchen nur schlecht nachweisbar, was repräsentativ in Abb.21C dargestellt ist.

Eine Ubiquitinierung in SVP Lysaten lässt sich für die Mutante N-Ubi 1 aufgrund der Abspaltung des Ubiquitins vom Leaderpeptid nicht nachweisen (Abb.21B, Spur 1). Das LP entspricht der ΔUbi 1-5 Mutante und trägt folglich keine internen Lysine mehr und kann somit nicht ubiquitiniert werden. Anders bei der N-Ubi 2 Mutante, die Ubiquitinbanden auch im höhermolekularen Bereich zeigt (Abb.21B, Spur 2). Dies liegt an den internen Lysinen im Ubiquitin, die ihrerseits wieder ubiquitiniert werden können. Interessanterweise können Ubiquitinbanden bei der N-Ubi 3 Mutante schwach identifiziert werden (Abb.21B, Spur 3).

Das bedeutet, dass das Fusionsprotein nicht vollständig gespalten wurde, aber immerhin so stark, dass es nicht mehr mit einem LP-spezifischen Antikörper detektiert werden konnte. Bei den Mutanten C-Ubi 1 und C-Ubi-2 kann man klar Signale für eine ubiquitinierte TM Domäne erkennen (Abb.21B, Spur 4, 5). Dies kann als Beweis dafür dienen, dass keine Spaltung zwischen TM und Ubiquitin stattgefunden hat. In der Spur 6 für die Δ Ubi 1-5 Mutante, ist, wie bereits beschrieben, kein Ubiquitin-spezifisches Signal zu erkennen.

Die Expression der Vorläuferproteine erscheint sehr heterogen (Abb.21C, Spur 1-6). Wenngleich man für manche Mutanten das gp130^{Env} Vorläuferprotein nur sehr schwach oder gar nicht erkennen kann, sind für alle Mutanten die LP Prozessierungsprodukte klar zu detektieren. Eine Ausnahme bildet die N-Ubi 2 Mutante, deren LP wahrscheinlich von einer Hintergrundbande verdeckt wird, die ungefähr bei 33kD läuft (Abb.21C, Spur 2). In den Spuren 1 und 3 kann man erneut die etwas höher laufenden LP Banden mit dem fusionierten Glyzin/Serin-Linker erkennen.

Die Mutanten, die ein fusioniertes Ubiquitin tragen scheinen in ihrer Fähigkeit, eine SVP Freisetzung zu induzieren, herabgesetzt zu sein. Diese Annahme lässt sich aus diesen Versuchen allerdings nicht eindeutig belegen, da die Expression der Vorläuferproteine nicht miteinander vergleichbar ist. Sicher ist, dass die Proteine, von welchen das Ubiquitin abgespalten wurde, keine phänotypische Veränderung zeigen und in gleichem Maße subvirale Partikel freisetzen wie die Δ Ubi 1-5 Mutante.

Die Mutante N-Ubi 2 (Abb.21A, Spur 2) scheint den ausgeprägtesten Phänotyp zu zeigen, und diente deswegen als Ausgangspunkt für die Herstellung weiterer Env/Ubi Fusionskonstrukte.

3.2.1.3 Klonierung weiterer Env/Ubi Fusionskonstrukte

Auf Basis der N-Ubi 2 Mutante wurden neue Konstrukte hergestellt, die Mutationen in der Aminosäuresequenz des Ubiquitins tragen. So sind die Aminosäuren Phenylalanin an Position 4 (F4A) und Isoleuzin an Position 44 (I44A) im Ubiquitin jeweils durch ein Alanin ersetzt worden. Diese Aminosäuren sind als essentiell für das intrinsische Internalisierungssignal von Ubiquitin beschrieben worden (Shih et al., 2000). Darüber hinaus sind zwei weitere Mutanten hergestellt worden, bei welchen jeweils ein Lysin innerhalb des Ubiquitins durch ein Arginin ausgetauscht wurde (K48R und K63R), um einer Bildung von Multiubiquitinketten entgegenzuwirken (Abb.22).

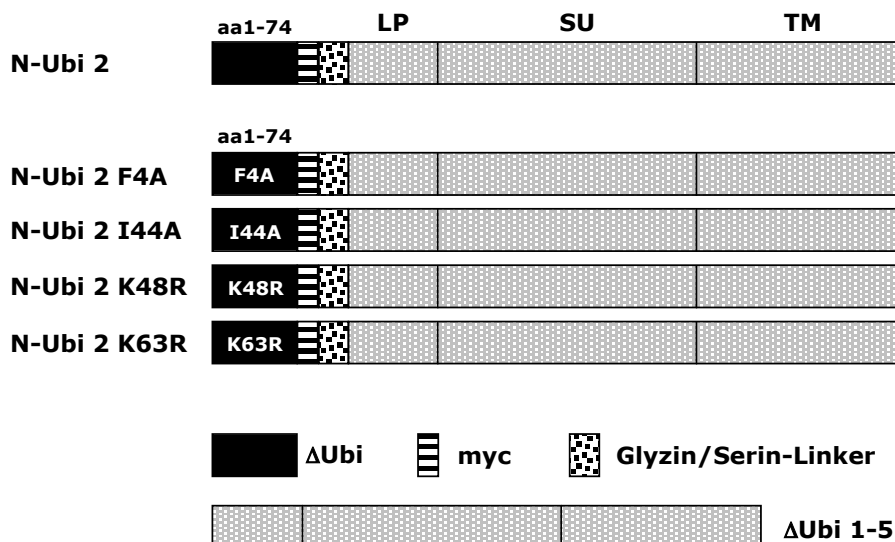


Abbildung 22: Schematische Darstellung weiterer Env/Ubi Fusionskonstrukte

Übersicht über die Fusionskonstrukte mit den jeweiligen Domänen. N-Ubi 2: pczHFVenvEM156, N-Ubi 2 F4A: pczHFVenvEM190, N-Ubi 2 I44A: pczHFVenvEM191, N-Ubi 2 K48R: pczHFVenvEM192, N-Ubi 2 K63R: pczHFVenvEM193.

Die Klonierungen basieren auf der Strategie für die N-Ubi 2 Mutante (Kap. 3.2.1.1). Deshalb sind im Folgenden nur die Ausgangsplasmide sowie die Primer für die PCR des jeweils ersten Inserts abgegeben.

Mutante	Vorlage	Primer
pczHFVenvEM190	pBJ5SR α Ubi F4A	2398 / 2347
pczHFVenvEM191	pBJ5SR α Ubi I44A	2399 / 2347
pczHFVenvEM192	pBJ5SR α Ubi K48R	2399 / 2347
pczHFVenvEM193	pBJ5SR α Ubi K63R	2399 / 2347

3.2.1.4 Biochemische Analyse aller Env/Ubi Fusionskonstrukte

Die Mutanten N-Ubi 1 und N-Ubi 3 wurden in der vorliegenden Arbeit nicht weiter verwendet, da sie durch die Abspaltung des Ubiquitins der Δ Ubi 1-5 Mutante entsprechen. Um den Phänotyp der N-Ubi 2 Mutante mit ihrer verringerten Partikelfreisetzung zu verifizieren, wurde diese erneut mitgeführt, genauso wie die Mutanten C-Ubi 2 und N/C-Ubi (Abb.20). Ob die neuen Fusionskonstrukte dem Phänotyp der N-Ubi 2 Mutanten entsprechen, oder davon abweichen und die Partikelfreisetzung noch stärker inhibieren, sollte in den folgenden biochemischen Analysen untersucht werden.

Dazu wurden die Env/Ubi Expressionsplasmide mit PEI in 293T Zellen transfiziert (Kap. 2.4.3.2) und diese dann nach 24h induziert (Kap. 2.4.4). Analog der Analyse der ersten Fusionsmutanten wurden auch hier die Zellkulturüberstände gewonnen (Kap. 2.5.2), sowie Zelllysate hergestellt (Kap. 2.4.5) und die Proben auf einem Trizin-SDS-Gel aufgetrennt (Kap. 2.6.1). Die Western Blot Analyse mit den entsprechenden Antikörpern (Kap. 2.6.2 und 2.6.4) folgte darauf.

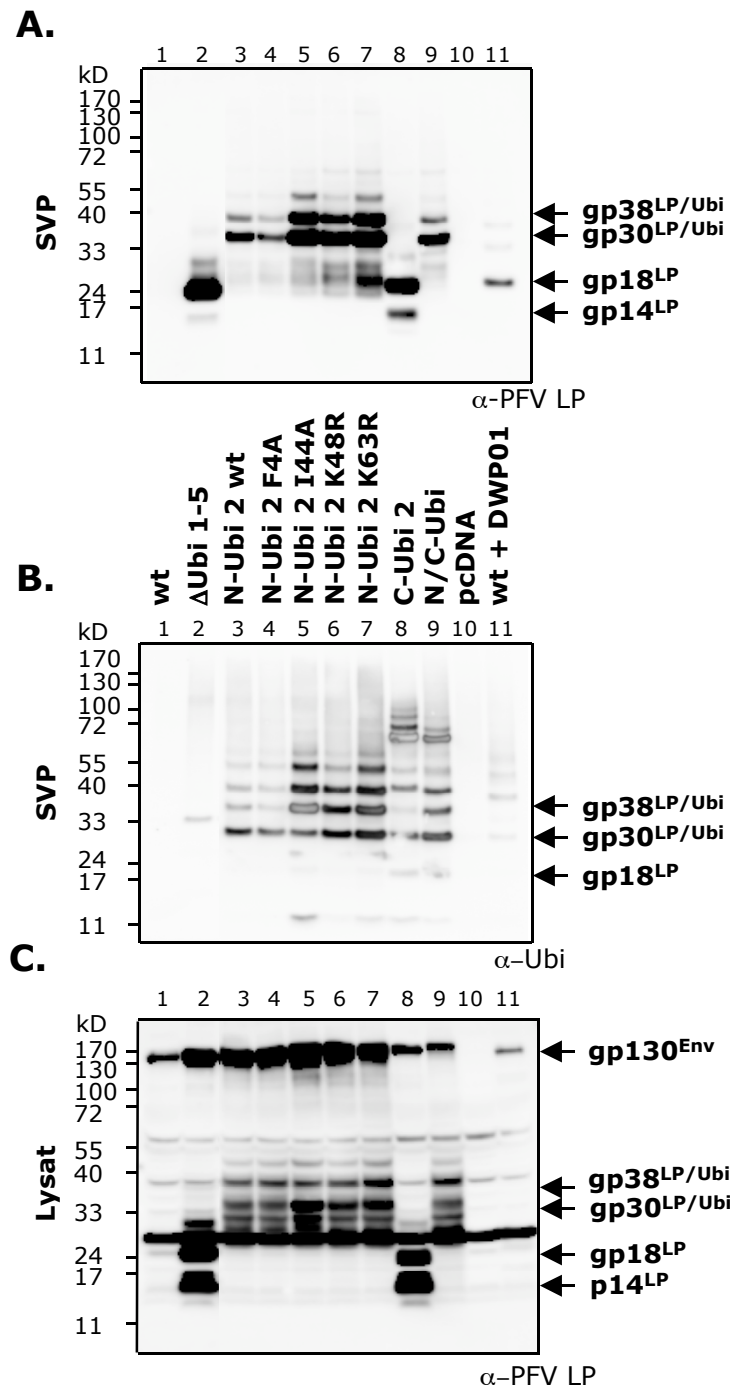


Abbildung 23: Biochemische Analyse verschiedener Env/Ubi Fusionsproteine

Western Blot Analyse transfizierter 293T Zellen (Lysat) und SVP haltiger Zellkulturüberstände (SVP). Subvirale Partikel wurden durch PEI Transfektion von 293T Zellen mit den entsprechenden Env/Ubi Expressionsplasmiden gewonnen. SVP wurden 48h p.T. über 20% Sucrose in einer Ultrazentrifuge aufgereinigt. Die Detektion erfolgte mit **(A)** Anti-PFV LP 1-86 (polyklonales Hasenserum), **(B)** Anti-Ubi P4D1 (monoklonaler Antikörper) und **(C)** Anti-PFV LP 1-86 (polyklonales Hasenserum). wt: pczHFVenvEM002, ΔUbi 1-5: pczHFVenvEM140, N-Ubi 2: pczHFVenvEM156, N-Ubi 2 F4A: pczHFVenvEM190, N-Ubi 2 I44A: pczHFVenvEM191, N-Ubi 2 K48R: pczHFVenvEM192, N-Ubi 2 K63R: pczHFVenvEM193, C-Ubi 2: pczHFVenvEM158, N/C-Ubi: pczHFVenvEM159.

Generell setzen die Ubiquitin Fusionsproteine (Abb.23A, Spur 3-9) im Vergleich zur Δ Ubi 1-5 Mutante (Abb.23A, Spur 2) weniger, im Vergleich zur wildtypischen Hüllproteinvariante (Abb.23A, Spur 1) jedoch deutlich mehr subvirale Partikel frei. Für die N-Ubi 2 F4A Mutante (Abb.23A, Spur 4) gilt das in besonderer Weise, da sie noch weniger SVP induziert als die Mutante N-Ubi 2. Das ist insofern interessant, da Phenylalanin an der Position 4 als wichtig für das Internalisierungssignal gilt. Dennoch scheint eine Inaktivierung dieser Aminosäure keinen großen Einfluß zu haben. Die Mutante N-Ubi 2 I44A (Abb.23A, Spur 5) hingegen setzt in stärkerem Maße subvirale Partikel als die vergleichbare N-Ubi 2 Mutante frei. Dieser Befund steht im Einklang mit der Literatur, wo das Isoleuzin ebenso als essentiell für das Internalisierungssignal beschrieben wird (Shih et al., 2000). Die Konstrukte, die einen Aminosäureaustausch von Lysin zu Alanin im Ubiquitin tragen, sind in ihrer Rate der SVP Freisetzung mit der N-Ubi 2 I44A vergleichbar (Abb.23A, Spur 6, 7). Die C-terminale Fusionsmutante, genauso wie die N/C-terminale (Abb.23A, Spur 8, 9) liegen in ihrer Rate der subviralen Partikelfreisetzung zwischen der N-Ubi 2 und der Δ Ubi 1-5 Mutante.

Eine Ubiquitinierung konnte für alle neuen Fusionskonstrukte nachgewiesen werden (Abb.23B, Spur 3-9). Auch ist hier erneut eine Ubiquitinierung der TM Domäne für die C-terminalen Konstrukte zu erkennen (Abb.23B, Spur 8, 9). Die Mutante Δ Ubi 1-5 zeigt wie erwartet keine Ubiquitin-Banden.

Die Expression der Proteine kann im Zelllysats (Abb.23C) miteinander verglichen werden. Die Vorläuferproteine der N-terminalen Fusionskonstrukte werden in vergleichbarem Maße wie die Δ Ubi 1-5 Mutante exprimiert (Abb.23C, Spur 2-7), die Banden der C-terminalen Konstrukte hingegen erscheinen etwas schwächer (Abb.23C, Spur 8, 9). Die Prozessierung scheint bei allen Mutanten statt zu finden, wenngleich die LP Banden der Δ Ubi 1-5 und der C-Ubi 2 Mutante etwas stärker erscheinen (Abb.23C, Spur 2, 8).

Um die Partikelfreisetzung genau bestimmen zu können, wurden die Banden mehrerer voneinander unabhängiger Versuche gemäß dem Kapitel 2.6.6 quantifiziert (Abb.24). Dazu wurden die SVP Proben auf das dazugehörige Zelllysats normalisiert. Das bedeutet, dass die Signale der Partikelblots mit einem Faktor multipliziert werden. Dieser Faktor ergibt sich aus einem Bezugssystem zur Standardprobe, die auf 1 gesetzt wird. Die Signalstärken der Lysatproben werden durch die Signalstärke des Standards dividiert. Der so ermittelte Wert ermöglicht eine Aussage über die Menge des exprimierten Proteins. Anhand dieser Werte können alle Zelllysatsproben rechnerisch auf das Niveau des Standards gehoben werden. Erst dieses Verfahren macht einen genauen Vergleich der SVP Signale möglich. Denn wird in einer transfizierten Zelle nur wenig Protein exprimiert, kann meist auch nur wenig freigesetzt werden. Diese Werte lassen sich dann aber nicht mit Proben unterschiedlich starker zellulärer Expression vergleichen. Mit dem Normalisieren der Zelllysatsignale trägt man diesem Problem Rechnung. Hierbei wurde die Mutante Δ Ubi 1-5 in einem relativen Bezugssystem als Standard auf 100% gesetzt.

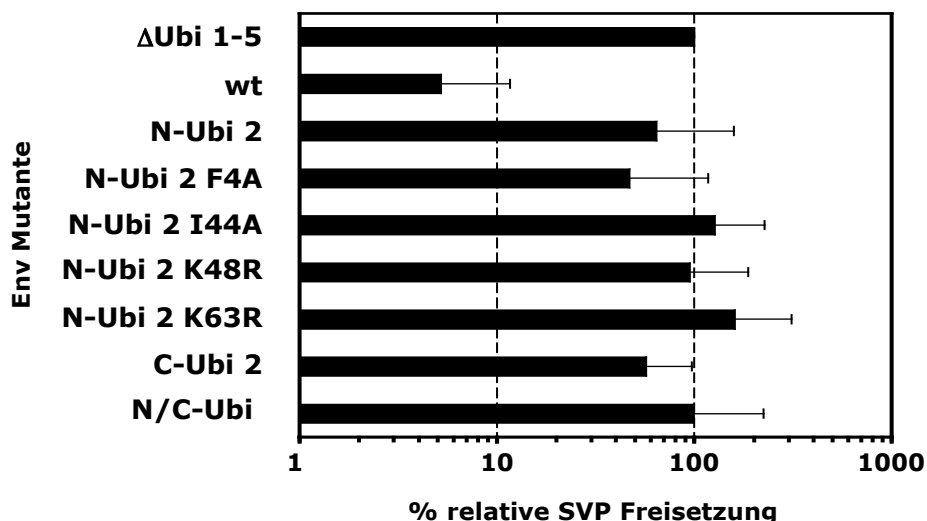


Abbildung 24: Quantifizierung der SVP Freisetzung der Env/Ubi Fusionsproteine

Western Blots wurden mit dem ECL⁺ Reagenz (GE Healthcare) im LAS 3000 (Fuji) entwickelt und die Signale mit der Image Gauge Software (Fuji) ausgewertet und quantifiziert (n=3). ΔUbi 1-5: pczHFVenvEM140, wt: pczHFVenvEM002, N-Ubi 2: pczHFVenvEM156, N-Ubi 2 F4A: pczHFVenvEM190, N-Ubi 2 I44A: pczHFVenvEM191, N-Ubi 2 K48R, pczHFVenvEM192, N-Ubi 2 K63R: pczHFVenvEM193, C-Ubi 2: pczHFVenvEM158, N/C-Ubi: pczHFVenvEM159.

Die Ergebnisse der Quantifizierung (Abb.24) entsprechen denen der optischen Auswertung. Die N-Ubi 2 Mutante liegt in ihrer Freisetzungsrates für SVP bei 64% relativ zur ΔUbi 1-5 Mutante, die in diesem Bezugssystem auf 100% gesetzt wurde. Die noch schwächere Intensität für die N-Ubi 2 F4A Mutante (Abb.23A, Spur 4) ließ sich auch in der Quantifizierung bestätigen. Sie liegt mit 47% deutlich unterhalb des Wertes für die N-Ubi 2 Mutante. Bei der N-Ubi 2 I44A Mutante hingegen kann man mit einem Wert von 127% keine Reduktion in der Partikelfreisetzung erkennen. Das gleiche gilt für alle anderen Mutanten, die sich auf dem Niveau der ΔUbi 1-5 Mutante befinden. Einzig die C-Ubi 2 Mutante ist mit 57% mit der N-Ubi 2 Mutante vergleichbar. Die Standardabweichungen ergeben sich aus den manchmal recht hohen Hintergrundfluoreszenzen der Immunoblotmembranen.

Diese Werte beziehen sich aber ausschließlich auf subvirale Partikel. Ob diese Hüllproteinmutanten in der Lage sind, foamyvirale Kapside zu umhüllen und freizusetzen, und ob diese Partikel noch infektiös sind, sollte im Folgenden geklärt werden.

3.2.2 Infektionsanalyse der Env/Ubi Fusionskonstrukte

Alle Env/Ubi Fusionsmutanten haben eine starke Freisetzung subviraler Partikel im Vergleich zum Wildtyp gezeigt. Ob sie aber in der Lage sind eine Sekretion viraler Partikel zu induzieren wurde durch eine Kotransfektion der Env Mutanten mit PFV Gag und Pol in einer Partikelpräparation analysiert.

Ein Teil der viralen Überstände für die Partikelpräparation wurde für eine Infektionsanalyse verwendet. So sind die Ergebnisse der Western Blot Analysen mit den Infektionsdaten direkt zu vergleichen.

Dazu wurden 293T Zellen mit den entsprechenden Env Expressionsplasmiden sowie einem PFV Vektor PEI-transfiziert (Kap. 2.4.3.2), induziert (Kap. 2.4.4) und lysiert (Kap. 2.4.5). Nun wurde von den gewonnenen Zellkulturüberständen jeweils eine Probe für die

Infektionsanalysen entnommen, der Rest über 20% Sucrose in einer Ultrazentrifuge aufgereinigt (Kap. 2.5.2 und 2.5.6). Außerdem wurden die Infektionen teilweise mehrfach ohne Partikelpräparation wiederholt.

Ähnlich wie für subvirale Partikel kann man eine gute Freisetzung viraler Partikel für alle Fusionsmutanten nachweisen (Abb.25). Wenngleich die zelluläre Expression des Vorläuferproteins nicht homogen erscheint (Abb.25A, Spur 1-10), kann man doch für alle Env-Mutanten starke LP-Prozessierungsbanden erkennen. Die Menge an Gag Proteinen ist in allen Spuren des Zelllysats auf einem vergleichbaren Niveau (Abb.25A, Spur 1-10).

Die LP Bandenintensitäten der freigesetzten Partikel entsprechen im Wesentlichen denen der subviralen Partikel (Abb.25B). Die Δ Ubi 1-5 Mutante zeigt die stärkste LP-Bande (Abb.25B, Spur 2) gleich gefolgt von der Mutante N-Ubi 2 I44A (Abb.25B, Spur 5). Die Mutanten N-Ubi-2 und N-Ubi 2 F4A (Abb.25B, Spur 3, 4) setzen auch im viralen Kontext relativ wenig Partikel frei, dies gilt auch hier für die N-Ubi 2 F4A in einem stärkeren Maße als für die N-Ubi 2 Mutante. Auffällig jedoch ist die niedrige Bandenintensität für die N/C-Ubi Mutante (Abb.25A/B, Spur 9). Obwohl sie im Zelllysate eine starke Prozessierung des Hüllproteins zeigt, sekretiert sie nur wenige virale Partikel. Die unterschiedlich starke Virusfreisetzung kann man gut an den unterschiedlichen Bandenintensitäten des Gag Proteins erkennen (Abb.25B, Spur 1-9).

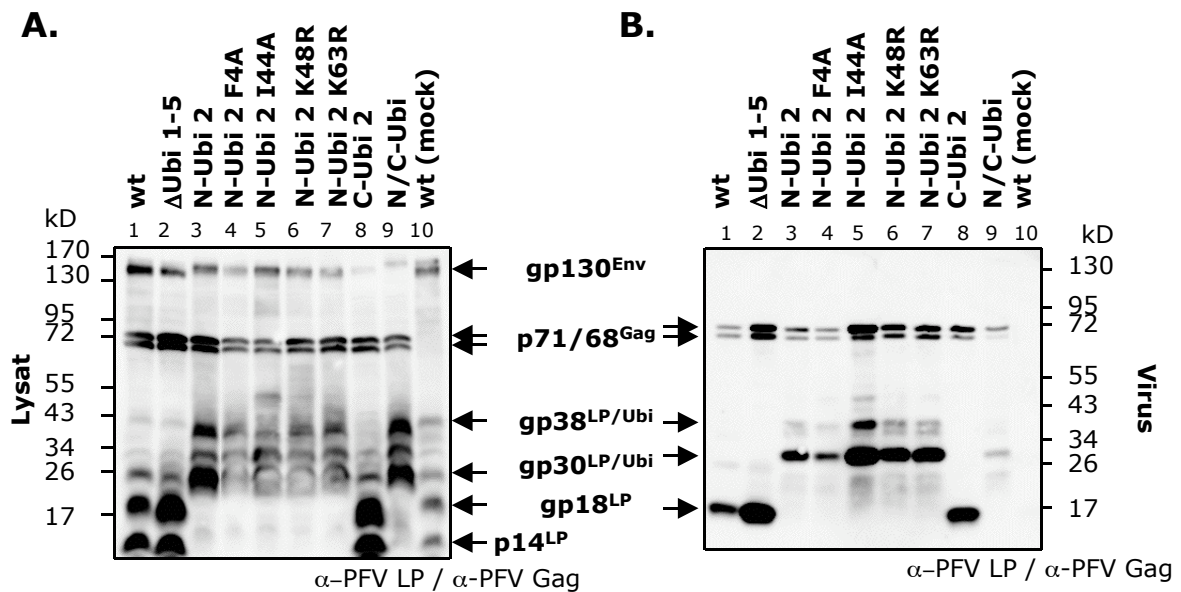


Abbildung 25: Virale Partikelpräparation der Env/Ubi Fusionsproteine

Western Blot Analyse transfizierter 293T Zellen (Lysat) und aufgereinigter PFV-haltiger Zellkulturüberstände (Virus). Die Zellen wurden mit PEI nach der Standardmethode transfiziert. Nach 48h p.T. wurden Zelllysate und Überstände gewonnen. Viruspartikel wurden über 20% Sucrose aufgereinigt. Alle Env-Expressionsplasmide wurden mit dem PFV Vektor pczDWP001 kotransfiziert. (A): Lysate transfizierter Zellen detektiert mit Anti-PFV LP 1-86 und Anti-PFV Gag 936 (polyklonale Hasenserien), (B): Aufgereinigte Viruspartikel detektiert mit Anti-PFV LP 1-86 und Anti-PFV Gag 936 (polyklonale Hasenserien), wt: pczHFVenvEM002, Δ Ubi 1-5: pczHFVenvEM140, N-Ubi 2: pczHFVenvEM156, N-Ubi F4A: pczHFVenvEM190, N-Ubi 2 I44A: pczHFVenvEM191, N-Ubi 2 K48R: pczHFVenvEM192, N-Ubi 2 K63R: pczHFVenvEM193, C-Ubi 2: pczHFVenvEM158, N/C-Ubi: pczHFVenvEM159, wt (mock): pcDNA3.1zeo + pczHFVenvEM002.

Die Infektionsanalyse erfolgte wie in Kap. 2.5.4 beschrieben. Die durch Zentrifugation und Filtration gereinigten virushaltigen Überstände wurden logarithmisch verdünnt und auf die am Vortag ausgesähten HT1080 Zellen gegeben. Nach 6h wurde die Infektion durch einen Mediumwechsel beendet und die Zellen für weitere zwei Tage in einem Brutschrank inkubiert. Die aufbereiteten Zellen (Kap. 2.4.6) wurden dann in einem FACS-Gerät auf eGFP-Expression untersucht.

Die Daten des Markergentransfers wurden in ein relatives Bezugssystem gebracht, in welchem die Δ Ubi 1-5 Mutante als Referenz auf 100% gesetzt wurde (Abb.26).

Die Analyse der Infektionseffizienzen (Abb.26) ergab eine um den Faktor 2 höhere Infektiosität der Δ Ubi 1-5 Mutante im Vergleich zum Wildtyp, was den Daten von Stanke und Kollegen (Stanke et al., 2005) entspricht. Wie durch die verminderte Partikelfreisetzung (Abb.25B) zu vermuten ist, sinkt die Infektiosität der N-Ubi 2 Mutante auf 33% der Δ Ubi 1-5 Mutante. Die N-Ubi 2 F4A Mutante ist mit 25% noch weniger infektiös. Interessant ist die N/C-Ubi Mutante, die bereits in der viralen Partikelfreisetzung stark reduziert war. Obgleich sie eine starke Prozessierung des Hüllproteins zeigt, ist sie mit nur 7%, verglichen mit dem Standard, nur sehr schwach infektiös. Bei dieser Mutante scheint ein funktioneller Defekt bei der Umhüllung von Kapsiden vorzuliegen, denn in der Freisetzung subviraler Partikel ist sie nicht von der Δ Ubi 1–5 Mutante zu unterscheiden.

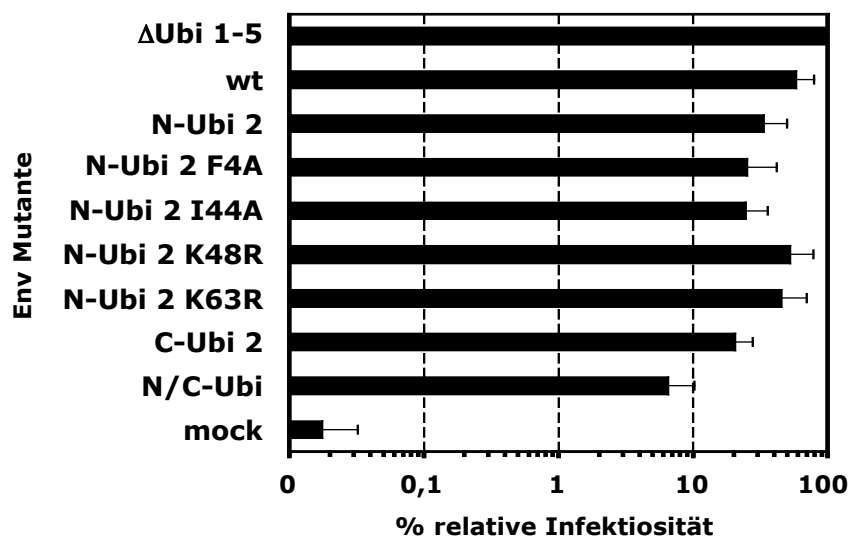


Abbildung 26: Infektionsanalyse der Env/Ubi Fusionsmutanten

FACS Analyse infizierter HT1080 Zellen. 293T Zellen wurden PEI transfiziert und die Überstände 48h p.T gewonnen. Die Infektion erfolgte für 6h, die FACS Analyse 48h nach Infektion. Alle Env-Mutanten wurden mit dem PFV Vektor pczDWP001 kotransfiziert, der eine eGFP-Reporterkassette enthält. Die Werte der Δ Ubi 1-5 Mutante wurden in einem relativen Bezugssystem auf 100% gesetzt (n=7-13). Δ Ubi 1-5: pczHFVenvEM140, wt: pczHFVenvEM002, N-Ubi 2: pczHFVenvEM156, N-Ubi 2 F4A: pczHFVenvEM190, N-Ubi 2 I44A: pczHFVenvEM191, N-Ubi 2 K48R: pczHFVenvEM192, N-Ubi 2 K63R: pczHFVenvEM193, C-Ubi 2: pczHFVenvEM158, N/C-Ubi: pczHFVenvEM159, mock: pczHFVenvEM002.

Generell lässt sich durch die biochemischen Nachweise und die Infektionsanalysen die Aussage treffen, dass eine Fusion von Ubiquitin an die PFV Hüllproteinmutante Δ Ubi 1-5 sowohl die subvirale Partikelfreisetzung als auch die Sekretion viraler Partikel herabsetzt. Deutlich wird dieser Phänotyp für die Mutanten N-Ubi 2 und N-Ubi 2 F4A. Interessanterweise hätte man für die N-Ubi 2 F4A einen anderen Phänotyp erwartet, da das Phenylalanin an

Position 4 als absolut notwendig für das in Ubiquitin enthaltene Internalisierungssignal beschrieben wurde (Shih et al., 2000). Statt dessen zeigt die Mutante jedoch bei einem Austausch dieser Aminosäure eine verringerte Freisetzung subviraler wie auch viraler Partikel. Diese vergleichsweise niedrige Sekretion von Viruspartikeln führt zu einer um 60% erniedrigten Infektionseffizienz verglichen mit der Δ Ubi 1-5 Mutante. Die I44A Mutante wiederum zeigt, genauso wie die internen Lysin Mutanten, keinen eindeutigen Phänotyp. Sie ist in ihrer SVP Freisetzung mit der Δ Ubi 1-5 Mutante vergleichbar, in ihrer Infektiosität jedoch auf dem Niveau der F4A Mutante. Das ließe den Schluß zu, dass das Isoleuzin an Position 44 innerhalb des Ubiquitins im Gegensatz zum Phenylalanin an Position 4, eine Rolle bei der Internalisierung spielt (Shih et al., 2000). Die Fusion von je einem Ubiquitin an den N- und C-Terminus des foamyviralen Hüllproteins (N/C-Ubi) führt zu einer weiteren phänotypischen Mutante. Diese ist in ihrer Fähigkeit, die Sekretion subviraler Partikel zu induzieren, im Vergleich mit der Δ Ubi 1-5 Mutante nicht beeinträchtigt, zeigt aber eine nur sehr niedrige Freisetzung viraler Partikel und dadurch eine schwache Infektiosität von nur 7%.

3.2.3 Klonierung und biochemische Analyse von Lysin-Mutanten

3.2.3.1 Klonierung der Lysin-Mutanten

Bislang wurde der Weg gewählt an eine Hüllproteinmutante, die ihrerseits nicht mehr ubiquitiniert werden kann, ein Ubiquitin anzuhängen. Dies geschah durch N- oder C-terminales Fusionieren eines Ubiquitins, oder einer mutierten Ubiquitinvariante. Diese Varianten trugen Aminosäureaustausche in funktionellen Domänen. Man konnte eine generelle Reduktion der Partikelfreisetzung beobachten, sowie eine, für die meisten Mutanten, herabgesetzte Infektiosität. Diese Beeinträchtigungen lagen in den Bereichen einer 2 bis 10fachen Reduktion der Partikelfreisetzung. Die untersuchten Mutanten befanden sich phänotypisch zwischen dem wildtypischen Hüllprotein und der Δ Ubi 1-5 Mutante.

Die Ubiquitinierung scheint einen graduellen Einfluß auf die Regulation der subviralen Partikelfreisetzung zu haben (Stanke et al., 2005). So zeigt eine Mutante, welche die ersten drei Lysine in ihrer LP-Domäne durch Arginine ersetzt trägt, eine verstärkte subvirale Partikelfreisetzung aber eine deutlich reduzierte Ubiquitinierung. Dies gilt in noch stärkerem Maße für die Mutante Δ Ubi 1-5, die eine im Vergleich zum Wildtyp 20 bis 50fach gesteigerte Freisetzung von SVP zeigt und deren LP keine nachweisbare Ubiquitinierung mehr trägt. Dieser sich verstärkende Phänotyp könnte auf einen kumulativen Effekt schließen lassen, oder möglicherweise sind es einzelne Lysine die eine besonders entscheidende Rolle bei der Regulation der Partikelfreisetzung durch Ubiquitin spielen.

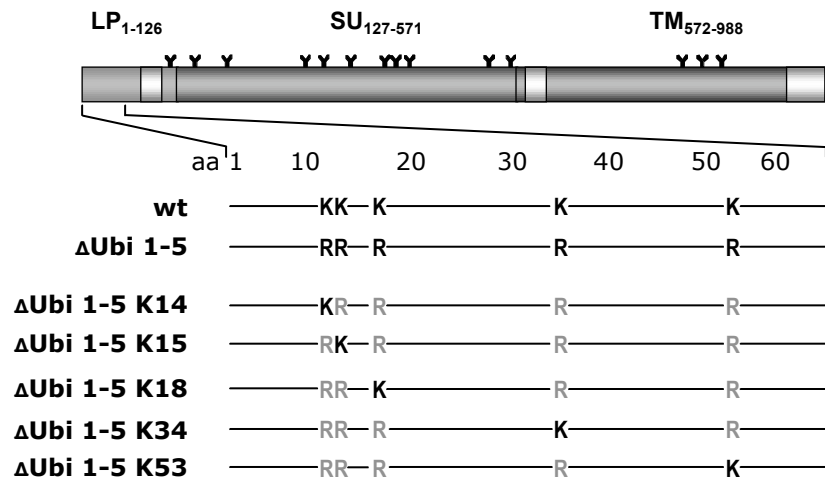


Abbildung 27: Schematische Darstellung der Lysin-Mutanten

Übersicht über die Domänenorganisation des foamyviralen Hüllproteins. Schematisch herausgehoben sind die ersten 65 Aminosäuren mit den für die Klonierungen wichtigen Aminosäuren. K: Lysin, R: Arginin, Y: potentielle N-Glykosylierungsstellen.

Um diesem Ansatz zu folgen und die Rolle der einzelnen Lysine innerhalb des Leaderpeptides zu analysieren, wurden neue Hüllproteinmutanten auf Basis der Δ Ubi 1-5 Mutante hergestellt. Dafür wurden einzelne Lysine durch einen Aminosäureaustausch an ihren natürlichen Positionen wiedereingeführt. Diese neuen Mutanten sind in Abbildung 27 dargestellt.

Alle durch Restriktionsverdaus gewonnenen DNA-Fragmente wurden über ein Agarosegel aufgetrennt (Kap. 2.3.4) und mit dem GeneClean Turbo Kit (Qiagen) entsprechend den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die fertigen Plasmide wurden mittels Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft.

pczHFVenvEM145 (Δ Ubi 1-5 K14)

Fragment	Vorlage	Primer	Enzyme	Länge [bp]
Vektor	pczHFVenvEM015		BsmBI / Kpn2I / CIAP	7489
Insert (a)	pczHFVenvEM140	2112 / 2381		315
Insert (b)	pczHFVenvEM140	2031 / 312		497
Insert	(a) + (b)	487 / 312	BsmBI / Kpn2I	473

pczHFVenvEM146 (Δ Ubi 1-5 K15)

Die Klonierung dieser Mutante erfolgte im Wesentlichen analog zu der für pczHFVenvEM145. Die Mutation wurde über eine PCR des Inserts (a) mit den Primern 2112 und 2382 eingeführt.

pczHFVenvEM147 (Δ Ubi 1-5 K18)

Die Klonierung unterschied sich von der für pczHFVenvEM145 nur in der Verwendung der Primer für das Insert (a). Es wurden die Oligonukleotide 2112 und 2383 verwendet.

pczHFVenvEM148 (Δ Ubi 1-5 K34)

Für die PCR der Inserts (a) und (b) wurden die Primerpaare 2112 / 2385 und 2384 / 312 verwendet. Ansonsten erfolgte die Klonierung wie für pczHFVenvEM145.

pczHFVenvEM149 (Δ Ubi 1-5 K53)

Die Klonierung basiert auf der für die Mutante pczHFVenvEM145. Die Mutation wurde eingeführt über eine PCR mit den Primerpaaren 2112 / 2387 für das Insert (a) und 2386 / 312 für das Insert (b).

3.2.3.2 Biochemische Analyse

Um den Einfluß einzelner Lysine in der LP-Domäne des PFV Env-Proteins zu analysieren, wurden die Lysin-Mutanten auf ihre Fähigkeit untersucht die Sekretion subviraler Partikel zu induzieren.

Dazu wurden die entsprechenden Env-Expressionsplasmide mittels PEI-Transfektion in 293T Zellen eingebracht (Kap. 2.4.3.2). Diese wurden anschließend mit Na-Butyrat induziert (Kap. 2.4.4) und 48h nach Transfektion lysiert (Kap. 2.4.5). Die Zellkulturüberstände wurden über 20% Sucrose in einer Ultrazentrifuge aufgereinigt (Kap. 2.5.6) und in Probenpuffer (Kap. 2.2.4) aufgenommen. Die gewonnenen Proben wurden in einem Trizin-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Kap. 2.6.1) und in einer Western Blot Analyse mit verschiedenen Antikörpern untersucht (Kap. 2.6.3).

Wie in Abbildung 28A (Spur 2) zu sehen ist, setzt die Δ Ubi 1-5 Mutante in sehr starkem Maße subvirale Partikel frei, im Gegensatz zum Wildtyp (Abb.28A, Spur 1) dessen Bande nur schwach zu erkennen ist. Eine SVP Freisetzung auf ähnlich hohem Niveau kann man für die Mutante Δ Ubi 1-5 K53 beobachten (Abb.28A, Spur 7), wohingegen die Mutanten Δ Ubi 1-5 K14 und K34 eine etwas geringere Sekretion zeigen (Abb.28A, Spur 3, 6). Die Freisetzung subviraler Partikel ist bei der Δ Ubi 1-5 K15 Mutante im Bezug auf die Δ Ubi 1-5 Mutante stark reduziert (Abb.28A, Spur 4). Für die Mutante K18, bei welcher das Lysin an Position 18 wiedereingeführt wurde, kann keine gp18^{LP}-Bande detektiert werden, was auf einen Verlust der SVP Freisetzung hindeutet (Abb.28A, Spur 5). Die höhermolekularen LP-Banden sind für alle Mutanten nur schwach zu erkennen (Abb.28A, Spur 1-7).

Wie erwartet, konnte für die Δ Ubi 1-5 Mutante keine Ubiquitinierung nachgewiesen werden (Abb.28B, Spur 2). Für den Wildtyp, sowie für die K18 Mutante (Abb.28B, Spur 1, 5) konnten ebenfalls keine Ubiquitin Banden detektiert werden, da, wie bereits durch Detektion mit dem LP-spezifischen Antiserum gezeigt, keine subviralen Partikel freigesetzt werden. Ebenso konnten auch für die K53 Mutante keine Banden nachgewiesen werden (Abb.28B, Spur 7), die mit einem Anti-Ubiquitin Antikörper reagiert hätten. Dieses Lysin an Position 5 im

PFV Hüllprotein scheint nicht ubiquitiniert zu werden. Für die Mutanten K14, K15 und K34 konnten Ubiquitinbanden nachgewiesen werden (Abb.28B, Spur 3, 4, 6).

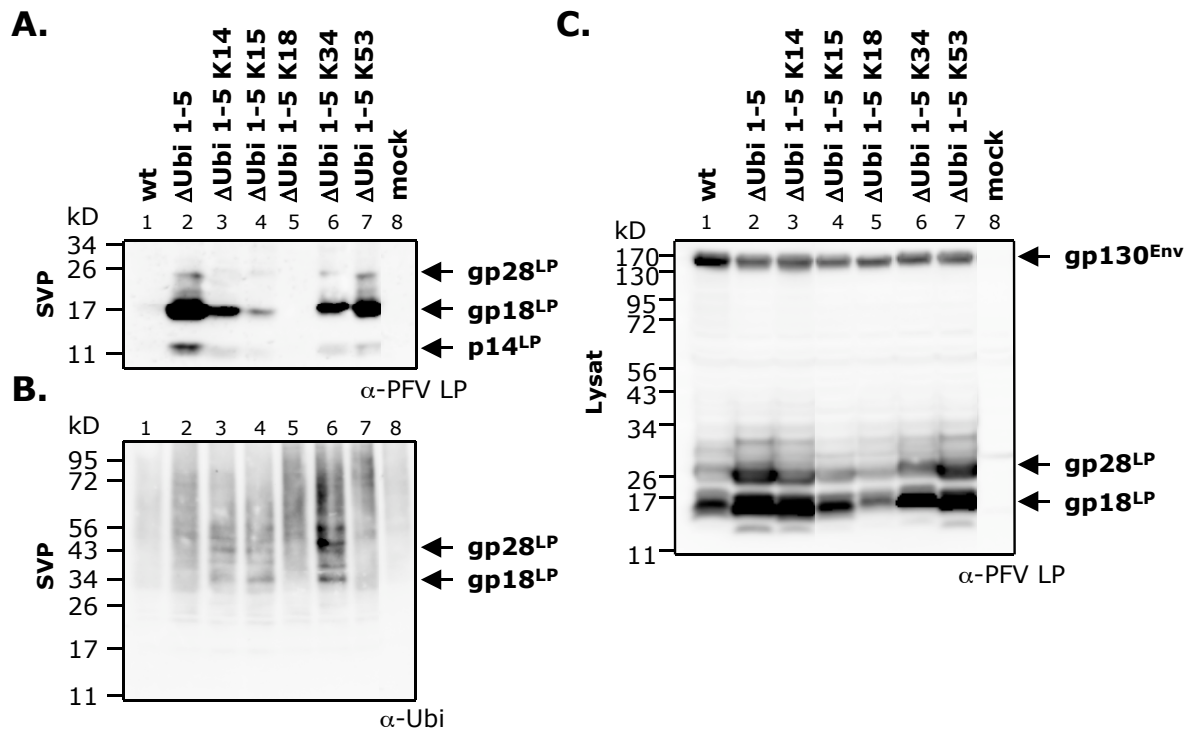


Abbildung 28: Biochemische Analyse der Lysin-Mutanten

Western Blot Analyse transfizierter 293T Zellen (Lysat) und SVP haltiger Zellkulturüberstände (SVP). Subvirale Partikel wurden durch PEI Transfektion von 293T Zellen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden der Lysin-Mutanten gewonnen. SVP wurden 48h p.T. über 20% Sucrose in einer Ultrazentrifuge aufgereinigt. Die Detektion erfolgte mit **(A)** Anti-PFV LP 1-86 (polyklonales Hasenserum), **(B)** Anti-Ubiquitin P4D1 (monoklonaler Antikörper) und **(C)** Anti-PFV LP 1-86 (polyklonales Hasenserum). wt: pczHFVenvEM002, ΔUbi 1-5: pczHFVenvEM140, ΔUbi 1-5 K14: pczHFVenvEM145, ΔUbi 1-5 K15: pczHFVenvEM146, ΔUbi 1-5 K18: pczHFVenvEM147, ΔUbi 1-5 K34: pczHFVenvEM148, ΔUbi 1-5 K53: pczHFVenvEM149, mock: pcDNA3.1zeo.

Die zelluläre Expression des Vorläuferproteins war für alle Lysin-Mutanten auf einem vergleichbarem Niveau (Abb.28C, Spur 1-7). Die Prozessierung des Hüllproteins hingegen scheint für die ΔUbi 1-5 K18 Mutante am stärksten herabgesetzt zu sein (Abb.28C, Spur 5).

Die biochemische Analyse der Lysin-Mutanten ergab eine Reihe interessanter Phänotypen. So scheint das Lysin an Aminosäureposition 53 nicht ubiquitiniert zu werden. Dies ließe sich damit erklären, dass Ubiquitin-Ligasen nahe an einer Membran befindliche Lysine nicht, oder nur sehr ineffizient, ubiquitinieren (Shih et al., 2000). Eine Ubiquitinierung konnte für diese Mutante in keinem Versuch je nachgewiesen werden. Phänotypisch verhält sie sich wie die ΔUbi 1-5 Mutante, was ebenfalls für eine fehlende Ubiquitinierung an dem Lysin an Position 53 spricht.

Die Mutante ΔUbi 1-5 K15 setzt weniger SVP frei, obgleich das zelluläre Expressionsniveau des Vorläufers dem der ΔUbi 1-5 Mutante entspricht. Diesen Phänotyp kann man bei der ΔUbi 1-5 K18 Mutante noch verstärkt beobachten, für die keine Sekretion subviraler Partikel mehr nachgewiesen werden konnte. Auch scheint ein Prozessierungsdefekt vorzuliegen.

Die Ubiquitinierung des Lysins an Position 18 scheint eine wesentliche Rolle bei der Regulation der SVP Freisetzung zu spielen. Eine Inaktivierung von Lysinen durch Aminosäureaustausch zu Arginin führt zu einem graduell ansteigenden Effekt bei der Freisetzung von subviralen Partikeln. Eine Fusion von Ubiquitin an die Δ Ubi 1-5 Mutante vermindert die Sekretion, genauso wie die Wiedereinführung von Lysinen an den natürlichen Positionen. Aber nur das Lysin an Position 18 hat einen dramatischen Einfluß. Wird dieses Lysin wiedereingeführt, tritt offenbar ein Prozessierungsdefekt auf und die SVP Freisetzung fällt unter die Detektionsgrenze ab.

3.2.3.3 Klonierung weiterer Lysin-Mutanten

Die Wiedereinführung eines Lysins an der Aminosäureposition 18 innerhalb des PFV Leaderpeptids führt zu einem totalen Verlust der SVP Freisetzung. Eine starke Reduktion konnte auch bei der Mutante beobachtet werden, die das Lysin an Position 15 wieder trägt. Aufgrund dieser Beobachtungen stellt sich die Frage, ob die genaue Aminosäureposition des Lysins wichtig ist, oder der gesamte Bereich zwischen den Lysinen an den Positionen 14 und 34 eine Rolle spielt. Um dieser Frage nachzugehen wurden neue Lysin-Mutanten hergestellt (Abb.29).

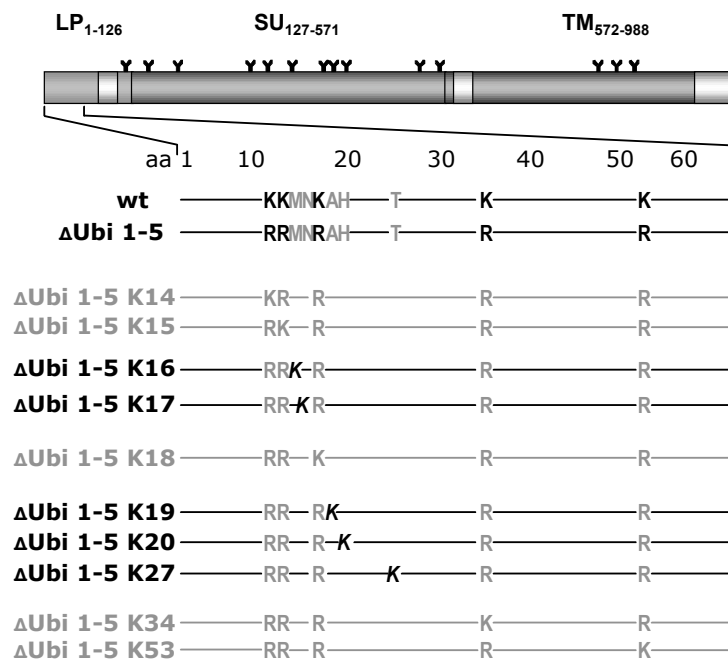


Abbildung 29: Schematische Darstellung aller Lysin-Mutanten

Übersicht über die Domänenorganisation des foamyviralen Hüllproteins. Schematisch herausgehoben sind die ersten 65 Aminosäuren mit den für die Klonierung wichtigen Aminosäuren. Bereits vorhandene Mutanten sind grau dargestellt K: Lysin, R: Arginin, M: Methionin, N: Asparagin, A: Alanin, H: Histidin, T: Threonin, Y: potentielle N-Glykosylierungsstellen.

Die Klonierungen basieren wiederum auf der Δ Ubi 1-5 Mutante. Um die Rolle der Aminosäureposition 18 genauer zu untersuchen, wurden Lysine eingeführt, die diese Position flankieren, nämlich an den Positionen 16 und 17, sowie an 19 und 20. Ein weiteres Lysin wurde an Position 27 eingeführt. Diese Position liegt genau in der Mitte zwischen dem dritten und vierten natürlich vorkommenden Lysin.

Alle bei den Klonierungen entstandenen DNA-Fragmente wurden nach einem Restriktionsverdau (Kap. 2.3.2) in einem Agarosegel (Kap. 2.3.4) aufgetrennt, die entsprechenden Banden ausgeschnitten und mit dem GeneClean Turbo Kit (Kap. 2.3.5) aufgereinigt. Die hergestellten Env-Expressionsplasmide wurden durch eine Sequenzierung (Kap. 2.3.11) auf ihre Richtigkeit überprüft.

Die Vektorfragmente aller Konstrukte basierten auf dem Plasmid pczHFVenvEM140. Dieses wurde mit BsmBI, Kpn2I und CIAP verdaut und anschließend aufgereinigt.

pczHFVenvEM195 (Δ Ubi 1-5 K16)

Fragment	Vorlage	Primer	Enzyme	Länge [bp]
Insert (a)	pczHFVenvEM140	2477 / 810		552
Insert (b)	pczHFVenvEM140	2478 / 594		879
Insert	(a) + (b)	594 / 810	BsmBI / Kpn2I	463

pczHFVenvEM196 (Δ Ubi 1-5 K17)

Fragment	Vorlage	Primer	Enzyme	Länge [bp]
Insert (a)	pczHFVenvEM140	2479 / 810		552
Insert (b)	pczHFVenvEM140	2480 / 594		882
Insert	(a) + (b)	594 / 810	BsmBI / Kpn2I	463

pczHFVenvEM197 (Δ Ubi 1-5 K19)

Fragment	Vorlage	Primer	Enzyme	Länge [bp]
Insert (a)	pczHFVenvEM140	2481 / 810		548
Insert (b)	pczHFVenvEM140	2482 / 594		888
Insert	(a) + (b)	594 / 810	BsmBI / Kpn2I	463

pczHFVenvEM198 (Δ Ubi 1-5 K20)

Fragment	Vorlage	Primer	Enzyme	Länge [bp]
Insert (a)	pczHFVenvEM140	2483 / 810		540
Insert (b)	pczHFVenvEM140	2484 / 594		895
Insert	(a) + (b)	594 / 810	BsmBI / Kpn2I	463

pczHFVenvEM199 (Δ Ubi 1-5 K27)

Fragment	Vorlage	Primer	Enzyme	Länge [bp]
Insert (a)	pczHFVenvEM140	2485 / 810		520
Insert (b)	pczHFVenvEM140	2486 / 594		915
Insert	(a) + (b)	594 / 810	BsmBI / Kpn2I	463

3.2.3.4 Biochemische Analyse aller Lysin-Mutanten

Um den Effekt der Mutationen im Bereich um die Aminosäureposition 18 im PFV Leaderpeptid auf die Freisetzung subviraler Partikel genauer zu untersuchen und um die Ergebnisse in einen Kontext zueinander stellen zu können, wurden im Folgenden stets alle Lysin-Mutanten zusammen betrachtet.

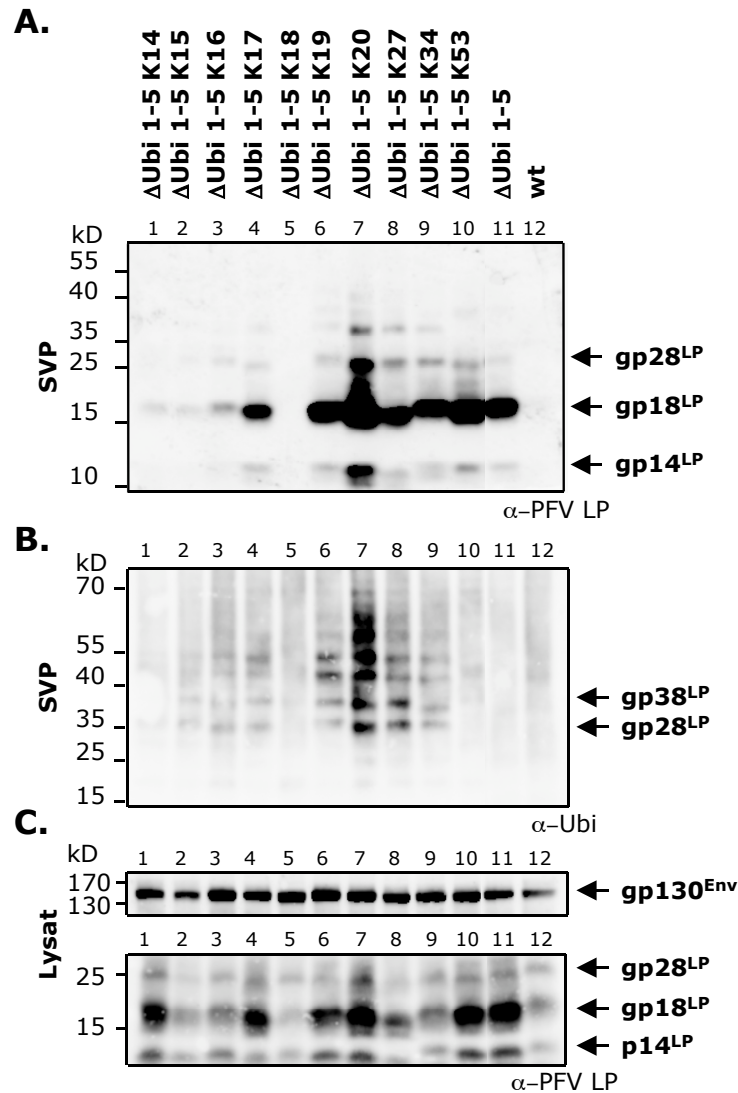


Abbildung 30: Biochemische Analyse aller Lysin-Mutanten

Western Blot Analyse transfizierter 293T Zellen (Lysat) und SVP haltiger Zellkulturüberstände (SVP). Subvirale Partikel wurden durch PEI Transfektion von 293T Zellen mit den Expressionsplasmiden der entsprechenden Lysin-Mutanten gewonnen. SVP wurden 48h p.T. über 20% Sucrose in einer Ultrazentrifuge aufgereinigt. Die Detektion erfolgte mit **(A)** Anti-PFV LP 1-86 (polyklonales Hasenserum), **(B)** Anti-Ubiquitin P4D1 (monoklonaler Antikörper) und **(C)** Anti-PFV LP 1-86 (polyklonales Hasenserum). ΔUbi 1-5 K14: pczHFVenvEM145, ΔUbi 1-5 K15: pczHFVenvEM146, ΔUbi 1-5 K16: pczHFVenvEM195, ΔUbi 1-5 K17: pczHFVenvEM196, ΔUbi 1-5 K18: pczHFVenvEM147, ΔUbi 1-5 K19: pczHFVenvEM197, ΔUbi 1-5 K20: pczHFVenvEM198, ΔUbi 1-5 K27: pczHFVenvEM199, ΔUbi 1-5 K34: pczHFVenvEM148, ΔUbi 1-5 K53: pczHFVenvEM149, ΔUbi 1-5: pczHFVenvEM140, wt: pczHFVenvEM002.

Dazu wurden die Env-Expressionsplasmide in 293T Zellen PEI transfiziert (Kap. 2.4.3.2) und diese dann nach 24h induziert (Kap. 2.4.4). Nach 48h wurden die Zellen lysiert (Kap. 2.4.5) und die SVP-haltigen Überstände aufgereinigt (Kap. 2.5.2). Die Proben wurden auf

einem Trizin-SDS-Polyacrylamidgel (Kap. 2.6.1) aufgetrennt und nach einem Western Blot mit Antikörpern nachgewiesen (Kap. 2.6.3).

Die bereits untersuchten Mutanten zeigen die für sie bekannten Phänotypen. Für die Mutante Δ Ubi 1-5 K18 konnte keine SVP Freisetzung nachgewiesen werden (Abb.30A, Spur 5). Die Hüllproteinmutanten K14 und K15, welche die ersten beiden Lysine wieder tragen (Abb.30A, Spur 1, 2), sind, relativ zur Δ Ubi 1-5 Mutante (Abb.30A, Spur 11), stark in ihrer Sekretion subviraler Partikel reduziert. Eine relativ starke Freisetzung zeigen die Mutanten K34 und K53 (Abb.30A, Spur 9, 10).

Die Mutante K16 (Abb.30A, Spur 3) verhält sich ähnlich wie die K15 Mutante und zeigt eine nur geringe Steigerung in der Freisetzung subviraler Partikel. Die K17 Mutante hingegen setzt wieder massiv Partikel frei (Abb.30A, Spur 4). Eine ähnlich dramatische Steigerung kann man bei der K20 Mutante beobachten (Abb.30A, Spur 7). Die Mutanten K19 und K27 (Abb.30A, Spur 6, 8) sind in ihrer Sekretionsrate mit der K34 Mutante zu vergleichen. Die Ubiquitin Banden sind, entsprechend der Freisetzungsraten, für manche Mutanten relativ schwach zu erkennen (Abb.30B), dennoch werden alle Lysine ubiquitiniert mit Ausnahme dem an Position K53 sowie der Δ Ubi 1-5 Mutante (Abb.30B, Spur 10, 11).

Die Expression des Env-Vorläuferproteins ist für alle Mutanten vergleichbar (Abb.30C), wohingegen dessen Prozessierung unterschiedlich stark erfolgt. Eine schwache Prozessierung kann man für die Mutanten K18, K15 und K16 erkennen (Abb.30C, Spur 2, 3, 5), wobei die Mutanten, die viele SVP freisetzen, auch eine starke Spaltung des Hüllproteins zeigen (Abb.30C, Spur 4, 6, 7, 10, 11), mit Ausnahme der K14 Mutante, die trotz effizienter Prozessierung eine nur schwache SVP Freisetzung zeigt (Abb.30, Spur 1).

Für eine quantitative Aussage über die Freisetzung subviraler Partikel, wurden Western Blots quantifiziert und die Signale auf die entsprechenden Zelllysate hin normalisiert. So kann die Rate der SVP Freisetzung einer jeden einzelnen Hüllproteinmutante unabhängig vom Grad der zellulären Expression des Proteins relativ zur Standardprobe ermittelt werden. Die Werte ergeben sich aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. Es wurde das Signal des gesamten Proteins, also Vorläuferprotein, sowie dessen Spaltprodukte, zur Auswertung quantifiziert. Die Δ Ubi 1-5 Mutante fungiert hier als Standardprobe und wird in diesem Bezugssystem stets auf 100% gesetzt.

Die Δ Ubi 1-5 Mutante setzt, wie von Stanke und Kollegen (Stanke et al., 2005) beschrieben, ca. 20fach mehr subvirale Partikel frei als das wildtypische Hüllprotein (Abb.31). Für die K18 Mutante kann auch bei der Quantifizierung der Western Blots keine SVP Freisetzung nachgewiesen werden. Die Mutanten K14, K15 und K16 liegen mit 7-12% des Standards auf einem dem wt vergleichbaren Niveau, die K17 Mutante jedoch bei über 53%. Die Hüllproteinvariante K20, die subjektiv eine hohe Partikelfreisetzung zeigt, liegt auch nach der Quantifizierung bei 168%, verglichen mit der Δ Ubi 1-5 Mutante. Das die fehlende Ubiquitinierung an Position 53 zu einem Phänotyp führt, der mit dem Standard zu vergleichen ist, lässt sich auch durch die Quantifizierung bestätigen.

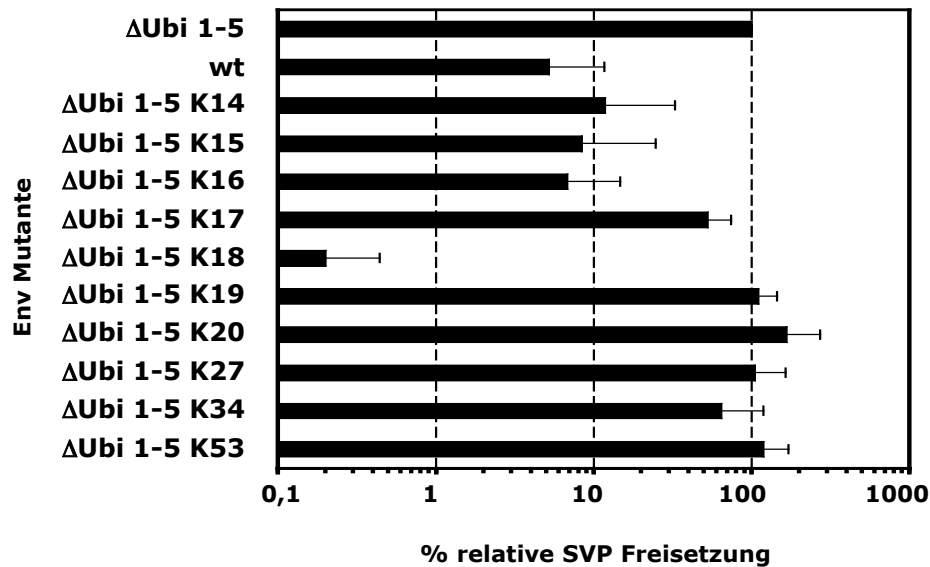


Abbildung 31: Quantifizierung der SVP Freisetzung aller Lysin-Mutanten

Western Blots wurden mit dem ECL⁺ Reagenz (GE Healthcare) im LAS 3000 (Fuji) entwickelt und die Signale mit der Image Gauge Software (Fuji) ausgewertet und quantifiziert (n=3). ΔUbi 1-5: pczHFVenvEM140, wt: pczHFVenvEM002, ΔUbi 1-5 K14: pczHFVenvEM145, ΔUbi 1-5 K15: pczHFVenvEM146, ΔUbi 1-5 K16: pczHFVenvEM195, ΔUbi 1-5 K17: pczHFVenvEM196, ΔUbi 1-5 K18: pczHFVenvEM147, ΔUbi 1-5 K19: pczHFVenvEM197, ΔUbi 1-5 K20: pczHFVenvEM198, ΔUbi 1-5 K27: pczHFVenvEM199, ΔUbi 1-5 K34: pczHFVenvEM148, ΔUbi 1-5 K53: pczHFVenvEM149.

Die Positionen der Lysine scheinen doch einen graduellen Einfluß auf die Freisetzung subviraler Partikel zu haben. So erscheint der Bereich zwischen der Aminosäureposition 14 und 20 der wichtigste in der Regulation der Freisetzung zu sein. Zeigen eingeführte Lysine an den Positionen 14-16 eine ca. 10fach reduzierte Freisetzung, steigt diese bei der Mutation der 17 Position wieder auf 50% an, um dann an Position 18 auf 0%, unter die Nachweisgrenze, zu fallen. Eine Mutation der Aminosäureposition 19 erweist sich als unauffällig, wohingegen ein Lysin an Position 20 die Freisetzung subviraler Partikel auf über 168% im Vergleich zur ΔUbi 1-5 Mutante hebt. Die Mutante, die ein Lysin an Position 27 trägt, also genau zwischen den natürlichen Positionen 18 und 34, verhält sich ohne Ausprägung eines abweichenden Phänotyps. Die Wiedereinführung der letzten beiden natürlichen Lysine führt im Falle der K34 Mutante zu einer leichten Verringerung der SVP Freisetzung, im Falle der K53 zu keiner auffallenden Veränderung. Das ist auch für diese Mutante nicht zu erwarten, da sie nicht ubiquitiniert wird, und somit der ΔUbi 1-5 Mutante entspricht.

3.2.3.5 Virale Partikelfreisetzung

Die bisher ermittelten Ergebnisse beziehen sich ausschließlich auf die Sekretion subviraler Partikel. Die Fähigkeit zur Freisetzung von Viruspartikeln kann sich aber deutlich von der für SVP unterscheiden. Um die Lysin-Mutanten auf ihre Fähigkeit zur Umhüllung foamyviraler Kapside zu untersuchen, wurden sie mit einem PFV Vektor kotransfiziert.

Die Lysin-Mutanten wurden dazu mit dem PFV Vektor pczDWP001 kotransfiziert (Kap. 2.4.3.2). Die 293T Zellen wurden 24h nach der PEI-Transfektion induziert (Kap. 2.4.4) und nach weiteren 24h lysiert (Kap. 2.4.5). Die viralen Überstände wurden über 20% Sucrose in

einer Ultrazentrifuge aufkonzentriert, und die gewonnenen Proben in einem Trizin-SDS-Polyacrylamidgel (Kap.2.5.6 und 2.6.1) aufgetrennt. Daran anschließend folgte eine Western Blot Analyse (Kap. 2.6.2 und 2.6.3).

Die Western Blot Analyse der viralen Partikel bestätigt den Phänotyp der K18 Mutante. Auch bei einer Koexpression der foamyviralen Proteine Gag und Pol ist keine Partikelfreisetzung nachzuweisen (Abb.32, Spur 5). Im Gegensatz zur Sekretion subviralen Partikel setzen die Mutanten K17 und K20 nur in geringem Maße Viruspartikel frei (Abb.32A, Spur 4, 7). Den restlichen Mutanten ist kein eindeutiger Phänotyp zuzuordnen, sie sekretieren Viruspartikel auf einem Niveau, welches mit dem Wildtyp oder der Δ Ubi 1-5 Mutante zu vergleichen ist (Abb.32A). Der Unterschied in der Partikelfreisetzung zwischen der wildtypischen und der Δ Ubi 1-5 Hüllproteinvariante ist im viralen Kontext bei weitem nicht so ausgeprägt wie bei subviralen Partikeln. Dies ist auch so von Stanke und Kollegen (Stanke et al., 2005) bereits beschrieben worden.

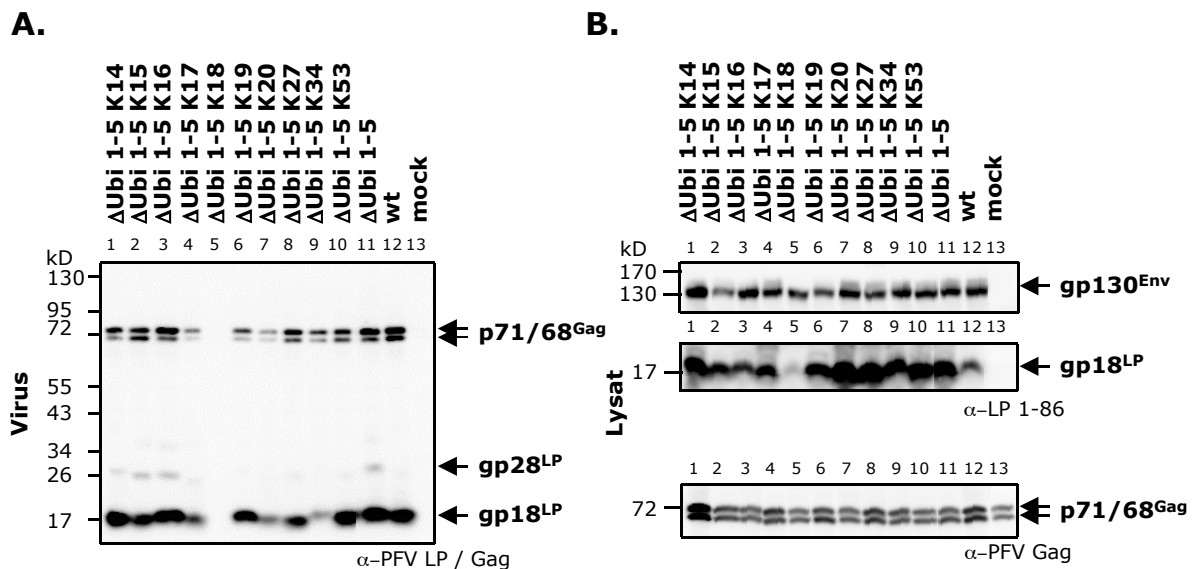


Abbildung 32: Virale Partikelpräparation aller Lysin-Mutanten

Western Blot Analyse transfizierter 293T Zellen (Lysat) und aufgereinigten PFV-haltigen Zellkulturüberständen (Virus). Die Zellen wurden mit PEI nach der Standardmethode transfiziert. Nach 48h p.T. wurden Zelllysate und Überstände gewonnen. Viruspartikel wurden über 20% Sucrose aufgereinigt. Alle Env-Expressionsplasmide wurden mit dem PFV Vektor pczDWP001 kotransfiziert. (A): Aufgereinigte Viruspartikel detektiert mit Anti-PFV LP 1-86 und Anti-PFV Gag 936 (polyklonale Hasenserien), (B): Lysate transfizierter Zellen detektiert mit Anti-PFV LP 1-86 und Anti-PFV Gag 936 (polyklonale Hasenserien). Δ Ubi 1-5 K14: pczHFVenvEM145, Δ Ubi 1-5 K15: pczHFVenvEM146, Δ Ubi 1-5 K16: pczHFVenvEM195, Δ Ubi 1-5 K17: pczHFVenvEM196, Δ Ubi 1-5 K18: pczHFVenvEM147, Δ Ubi 1-5 K18: pczHFVenvEM197, Δ Ubi 1-5 K20: pczHFVenvEM198, Δ Ubi 1-5 K27: pczHFVenvEM199, Δ Ubi 1-5 K34: pczHFVenvEM148, Δ Ubi 1-5 K53: pczHFVenvEM149, Δ Ubi 1-5: pczHFVenvEM140, wt: pczHFVenvEM002, mock: pczDWP001.

Die zelluläre Expression des Env-Vorläufers und des Gag-Proteins ist bei allen Mutanten vergleichbar (Abb.32B, Spur 1-13). Bei der Detektion der Leaderpeptid-Domäne hingegen kann erneut klar ein Prozessierungsdefekt für die K18 Mutante gezeigt werden (Abb.32B, Spur 5). Die Prozessierung des wildtypischen Hüllproteins ist wiederum weniger effizient als bei der Δ Ubi 1-5 Mutante (Abb.32B, Spur 11&12).

Um aber auch eine quantitative Aussage über die Freisetzung viraler Partikel treffen zu können, wurden die Western Blots mit der Image Gauge Software (Fuji) quantifiziert und ausgewertet. Die Freisetzung wurde ebenfalls auf die zelluläre Expression hin normalisiert. Bei der Auswertung der Partikelblots wurden die Gag Banden als Maß für die Virussekretion genommen. Da Gag-Proteine nur dann von transfizierten Zellen sekretiert werden, wenn gleichzeitig das entsprechende Hüllprotein in der Zelle vorliegt, können diese Proteine gut als Maß für eine Freisetzung verwendet werden (Baldwin et al., 1998; Fischer et al., 1998). Die Verwendung der Gag Banden als Maß für die virale Partikelfreisetzung birgt einen weiteren Vorteil. Die Lysin-Mutanten setzen wahrscheinlich parallel zu viralen Partikeln auch SVP frei was zu verstärkten LP-Banden führen würde. Durch die Quantifizierung der Gag Banden kann man ausschließen das subvirale Partikel die Ergebnisse verfälschen.

Die Mutante Δ Ubi 1-5 wurde in diesem relativen Bezugssystem auf 100% gesetzt.

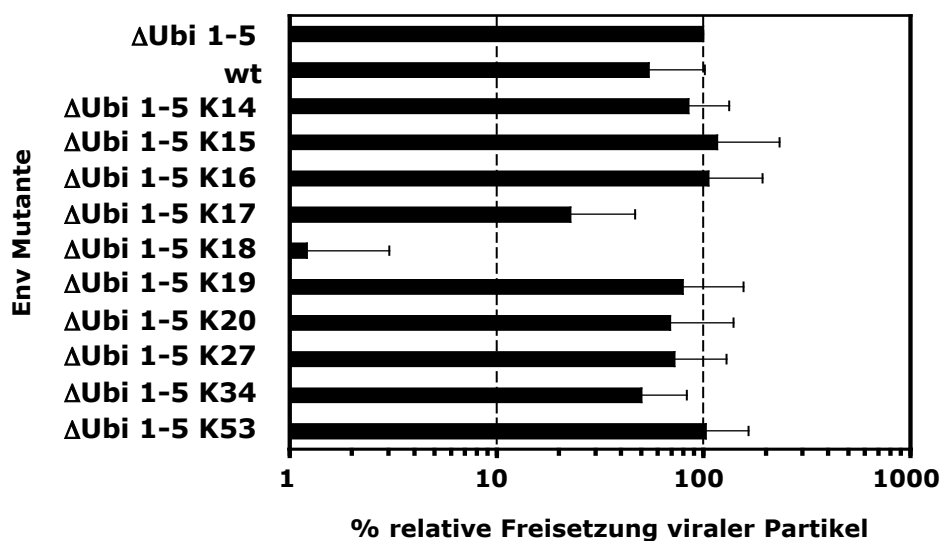


Abbildung 33: Quantifizierung der viralen Partikelfreisetzung aller Lysin-Mutanten

Western Blots wurden mit dem ECL⁺ Reagenz (GE Healthcare) im LAS 3000 (Fuji) entwickelt und die Signale mit der Image Gauge Software (Fuji) ausgewertet und quantifiziert (n=3). Δ Ubi 1-5: pczHFVenvEM140, wt: pczHFVenvEM002, Δ Ubi 1-5 K14: pczHFVenvEM145, Δ Ubi 1-5 K15: pczHFVenvEM146, Δ Ubi 1-5 K16: pczHFVenvEM195, Δ Ubi 1-5 K17: pczHFVenvEM196, Δ Ubi 1-5 K18: pczHFVenvEM147, Δ Ubi 1-5 K19: pczHFVenvEM197, Δ Ubi 1-5 K20: pczHFVenvEM198, Δ Ubi 1-5 K27: pczHFVenvEM199, Δ Ubi 1-5 K34: pczHFVenvEM148, Δ Ubi 1-5 K53: pczHFVenvEM149.

Die quantitative Analyse der Virusfreisetzung ergab eine um den Faktor 2 höhere Sekretionsrate der Δ Ubi 1-5 Mutante im Vergleich zum Wildtyp (Abb.33) (vgl. Stanke et al., 2005). Für die Mutante Δ Ubi 1-5 K18, für die auch keine Freisetzung subviraler Partikel nachgewiesen werden konnte, ergab auch die Quantifizierung viraler Partikel nur ein auf Hintergrundniveau liegendes Signal. Die dem Standard entsprechende K53 Mutante tut dies mit 103% auch nach der Quantifizierung. Die Mutanten K14, K15 und K16 zeigen im Vergleich zur subviralen Partikelfreisetzung einen 8 bis 10fachen Anstieg der Freisetzungsraten auf 86-117%. Die Mutante K17 hingegen erscheint in diesem Bezug in ihrer Freisetzung viraler Partikel um den Faktor 2 auf 23% reduziert. Die Mutanten K19, K20 und K27 hingegen setzen um den Faktor 0,5 bis 2 weniger virale Partikel frei, wenn man diese Werte mit denen für die SVP Freisetzung vergleicht.

Vergleicht man die Quantifizierung der viralen mit der subviralen Partikelfreisetzung, lassen sich interessante Unterschiede für einzelne Mutanten feststellen. Setzen die Mutanten K14, K15 und K16 im subviralen Kontext mit 10% der Δ Ubi 1-5 Mutante nur relativ wenige Partikel frei, steigt die Rate auf 85% bis 117% im viralen Kontext. Die Hüllproteinvarianten, die ihr Lysin an einer Position hinter der dritten natürlichen Position tragen, setzen mit 105 bis 168% zum Standard relativ viel SVP, dagegen mit 69% bis 79% weniger Viruspartikel frei. Die K34 und K53 Mutanten zeigen keine wesentlichen Unterschiede in ihrer relativen Partikelfreisetzung. Sie setzen im viralen Kontext stets geringfügig weniger Partikel frei als im subviralen. Einzig bei der Δ Ubi 1-5 K18 Mutante können weder subvirale noch virale Partikel nachgewiesen werden. Bei dieser Mutante scheint einen Defekt in der Prozessierung des Hüllproteins vorzuliegen, darüber hinaus ist sie weder in der Lage subvirale Partikel freizusetzen, noch effizient foamyvirale Kapside zu umhüllen und diese zu sekretieren.

3.2.4 Infektionsanalyse der Lysin-Mutanten

Die biochemischen Analysen der Lysin-Mutanten ergaben hinsichtlich der Freisetzung subviraler und viraler Partikel eine Reihe von Phänotypen, die sich von der Standard-Mutante Δ Ubi 1-5 unterscheiden. Jedoch konnte für alle Mutanten, mit Ausnahme der Δ Ubi 1-5 K18 Variante, eine Freisetzung viraler Partikel nachgewiesen werden. Ob diese detektierten Proteinbanden aber von infektiösen oder defekten Viruspartikeln stammen, die keine Infektiosität mehr aufweisen, sollte in einer FACS-Analyse untersucht werden.

Dazu wurden 293T Zellen mit den entsprechenden PFV Env-Expressionsplasmiden und dem foamyviralen Vektor pczDWP001 ko-transfiziert. Die Zellen wurden mit PEI transfiziert (Kap. 2.4.3.2) und 24h nach Transfektion induziert (Kap. 2.4.4). Nach weiteren 24h Inkubation in einem Brutschrank wurden die virushaltigen Überstände geerntet und gemäß dem Kapitel 2.5.2 aufbereitet. Die Infektion der HT1080 Zellen erfolgte, in geeigneten Verdünnungsstufen, für 6h und wurde durch einen Mediumwechsel beendet (Kap. 2.5.4). Die infizierten Zellen wurden für weitere 48h in einem Brutschrank gehalten bevor sie für eine FACS-Analyse abgelöst und aufbereitet wurden (Kap. 2.4.6).

Die ermittelten Rohdaten wurden in ein relatives Bezugssystem gebracht, in welchem die Δ Ubi 1-5 Mutante als Standard auf 100% gesetzt wurde.

Die Ergebnisse der Infektionsanalysen (Abb.34) entsprachen im Wesentlichen den Daten der viralen Partikelfreisetzung. Viruspartikel mit dem wildtypischen PFV Hüllprotein zeigten eine um die Hälfte reduzierte Infektiosität verglichen mit der Δ Ubi 1-5 Mutante. Wurden die Daten der Infektionsanalyse in ein relatives System gebracht, mit der Δ Ubi 1-5 Mutante als Standard, so erreichten die Mutanten K14, K15 und K16 eine relative Infektiosität von 70% bis 103%. Auch die Mutanten K19, K27, K34 und K53 entsprachen in ihrer relativen Infektiosität den Werten der Partikelfreisetzung. Das deutet daraufhin, dass die Mehrheit der im Western Blot detektierten Partikel auch infektiös ist. Die Mutanten K17 und K20 hingegen zeigten gewisse Abweichungen. Lag die virale Partikelfreisetzung für die K17 Mutante bei 23% des Standards, erweist sich ihre Infektiosität mit 13% um die Hälfte verringert. Dies gilt auch für die Mutante K20, die eine Reduktion von 70% auf 44% zeigt. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass ein Teil der freigesetzten Partikel so genannte physikalische oder

defekte Partikel sind, und somit der Aminosäureaustausch an diesen Positionen zu einer Verringerung der Infektiosität bei gleichzeitiger Partikelfreisetzung führt.

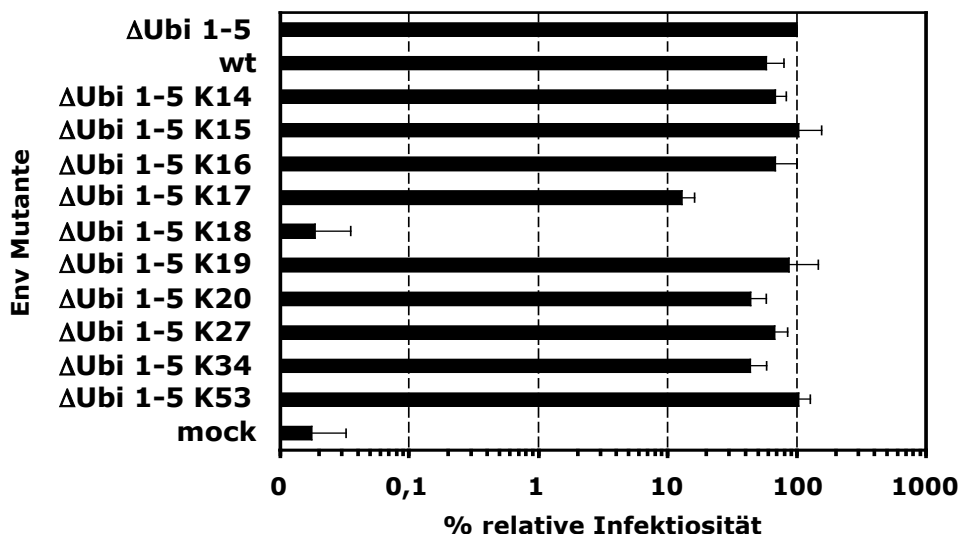


Abbildung 34: Infektionsanalyse der Lysin-Mutanten

FACS Analyse infizierter HT1080 Zellen. 293T Zellen wurden PEI transfiziert und die Überstände 48h p.T gewonnen. Die Infektion erfolgte für 6h, die FACS Analyse 48h nach Infektion. Alle Env-Mutanten wurden mit dem PFV Vektor pczDWP001 kotransfiziert, der eine eGFP-Reporterkassette enthält. Die Werte der ΔUbi 1-5 Mutante wurden in einem relativen Bezugssystem auf 100% gesetzt (n=9-13). ΔUbi 1-5: pczHFVenvEM140, wt: pczHFVenvEM002, ΔUbi 1-5 K14: pczHFVenvEM145, ΔUbi 1-5 K15: pczHFVenvEM146, ΔUbi 1-5 K16: pczHFVenvEM195, ΔUbi 1-5 K17: pczHFVenvEM196, ΔUbi 1-5 K18: pczHFVenvEM147, ΔUbi 1-5 K19: pczHFVenvEM197, ΔUbi 1-5 K20: pczHFVenvEM198, ΔUbi 1-5 K27: pczHFVenvEM199, ΔUbi 1-5 K34: pczHFVenvEM148, ΔUbi 1-5 K53: pczHFVenvEM149, mock: pczHFVenvEM140 + pcDNA3.1zeo.

Wie von den Ergebnissen der viralen Partikelfreisetzung zu erwarten war, ist für die ΔUbi 1-5 K18 Mutante keinerlei Infektiosität über dem Wert der Negativkontrolle nachweisbar. Dies ist der Tatsache geschuldet, dass von dieser Mutante keine Partikel mehr freigesetzt werden.

3.2.5 Oberflächenbiotinylierung ausgewählter Lysin-Mutanten

Die bisherigen Analysen der Lysin-Mutanten brachten einen besonders ausgeprägten Phänotyp hervor. Die Wiedereinführung eines Lysins an der natürlichen Aminosäureposition 18 im PFV Leaderpeptid der ΔUbi 1-5 Mutante scheint einen dramatischen Einfluß auf die Biosynthese des Proteins zu haben. In Western Blot Analysen konnte gezeigt werden, dass das Protein nur sehr ineffizient in seine funktionellen Untereinheiten gespalten wird. Obgleich eine starke Proteinbande für das Vorläuferprotein gp130^{Env} nachgewiesen werden kann, lässt sich die dazugehörige LP-Bande in nur sehr geringem Maße detektieren, was im Kontrast zur ΔUbi 1-5 Mutante steht. Eine Sekretion subviral, sowie viraler Partikel konnte für diese Mutante ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Ein ähnlicher Defekt in Bezug auf die Prozessierung und Freisetzung viraler Partikel ist auch für eine Hüllproteinmutante nachgewiesen worden, bei welcher die achte N-Glykosylierungsstelle durch einen Aminosäureaustausch inaktiviert wurde. Für diese Mutante konnte gezeigt werden, dass keine Proteindomänen auf der Oberfläche transfizierter Zellen

nachzuweisen sind. Dies deutet auf einen Prozessierungs- und Transportdefekt des Proteins auf dem Weg an die Zelloberfläche hin.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Δ Ubi 1-5 K18 Hüllproteinmutante einen Transportdefekt aufweist und folglich nicht auf der Oberfläche transfizierter Zellen nachzuweisen ist. Darüberhinaus wäre es denkbar, dass durch die Anwesenheit anderer foamyviraler Proteine die intrazelluläre Verteilung und der Transport des Hüllproteins durch die entsprechenden Kompartimente beeinflusst werden könnte. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden Oberflächenbiotinylierungsversuche durchgeführt. Dazu wurden 293T Zellen entweder nur mit den jeweiligen Expressionsplasmiden der PFV Env-Mutanten, oder in einem weiteren Ansatz zusammen mit einem PFV Vektor kotransfiziert.

Für diesen Nachweis wurden die ursprünglichen Lysin-Mutanten verwendet, da sie alle beobachteten Phänotypen aufzeigen. Eine Wiedereinführung eines Lysins an der Positionen 14 resultierte in einer 10fach verringerten SVP Freisetzung, wohingegen die Freisetzung viraler Partikel kaum beeinträchtigt war. Ähnliches gilt für die Mutante K15. Bei der Mutante K34 hingegen war sowohl die Sekretion subviraler als auch viraler Partikel im Vergleich zur Δ Ubi 1-5 Mutante um den Faktor 2 herabgesetzt. Eine Wiedereinführung eines Lysins an Position 53 hatte keinen Einfluß auf den Phänotyp dieser Mutante. Dieses Lysin wird nicht ubiquitiniert und daher zeigt dieses Hüllprotein ebenfalls keinen veränderten Phänotyp, im Vergleich zur Δ Ubi 1-5 Mutante. Ein Lysin an Position 18 hingegen verringert die Prozessierung des Proteins und verhindert jegliche Freisetzung von SVP und Viruspartikeln.

Dieser repräsentative Satz von Mutanten wurde für eine Analyse der Oberflächenexpression verwendet. Dazu wurden 293T Zellen mit Ca_2PO_4 transfiziert (Kap. 2.4.3.1) und diese dann nach 24h induziert (Kap. 2.4.4). Nach der Induktion wurden die Zellen erneut über Nacht in einem Brutschrank inkubiert und direkt vor Beginn des Versuches auf Eis überführt. Dies dient dazu, jegliche Endozytoseaktivität von der Zelloberfläche in die Zellen zu unterbinden, da diese Prozesse bei 4°C nicht mehr ablaufen. Die selektive Biotinylierung der auf der Zelloberfläche exprimierten Proteine wurde wie in Kap. 2.6.7.2 beschrieben durchgeführt. Durch die Verfügbarkeit geeigneter Antikörper konnte auf eine Durchführung mit radioaktiv markierten Aminosäuren verzichtet werden. Eine Immunopräzipitation folgte auf die Lyse der transfizierten Zellen und das Abtrennen unlöslicher Zellbestandteile der Lysate. Hierbei wurden diese mit einem Foamyvirus negativen Serum vorinkubiert, die Hauptinkubation erfolgte mit einem Gemisch eines FV positiven Schimpansen-serums und eines polyklonalen Hasenantikörpers gegen die ersten 86 Aminosäuren des foamyviralen Leaderpeptides. Die gewonnenen Proben wurden über ein Trizin-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Kap. 2.6.1) und in einer Western Blot Analyse (Kap. 2.6.2 und 2.6.3) auf PFV Proteine untersucht.

Durch die Inkubation eines Western Blots mit Streptavidin-HRP kann man Biotin, bzw. biotinylierte Proteine nachweisen. In den Spur 1 und 3-8 der Abb.35A ist für alle Mutanten sowie für das wildtypische Env die biotinylierte gp130^{Env} Bande zu erkennen. Die Spaltprodukte gp80^{SU} und gp48TM sind mit Ausnahme der K18 Mutante (Abb.35A, Spur 6) ebenfalls für alle Hüllproteine nachzuweisen. Die Intensität der Banden jedoch variiert. Wie bereits gezeigt, ist die Oberflächenexpression des wildtypischen Hüllproteins (Abb.35A, Spur 3) relativ schwach im Vergleich zur Δ Ubi 1-5 Mutante (Abb.35A, Spur 1), vor allem im Hinblick auf deren Prozessierungsprodukte. Die K53 Mutante (Abb.35A, Spur 8) gleicht auch

in diesem Versuch in jeglicher Hinsicht der Δ Ubi 1-5 Mutante. Die Banden der Mutanten K14, K15 und K34 (Abb.35A, Spur 4, 5, 7) liegen in ihren Intensitäten zwischen denen des Wildtyps und denen der Δ Ubi 1-5 Mutante. Alleine für die K18 Mutante (Abb.35A, Spur 6) konnten keine biotinylierten Env-Prozessierungsprodukte auf der Oberfläche der transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Durch die Inkubation mit einem PFV Env-spezifischen Antikörper kann die Gesamtexpression des Proteins in den transfizierten Zellen ermittelt werden. Diese lag für alle Mutanten wie für den Wildtyp auf einem vergleichbaren Niveau (Abb.35A, Spur 1 und 3-8). Das Mitführen einer Gag-Probe sowie die Detektion mit einem Gag-spezifischen Antikörper (Abb.35A, Spur 9) diente sowohl als Präzipitationskontrolle für das Affenserum, welches alle PFV Proteine erkennen und präzipitieren sollte, als auch als Kontrolle für die Membranintegrität während der Biotinylierung.

Die Detektion mit einem SU-spezifischen Antikörper ergab erneut einen Prozessierungsdefekt für die K18 Mutante (Abb.35A, Spur 6). Für alle anderen Proteine, einschließlich des Wildtyps, konnte eine Env-Prozessierung durch die Detektion des Vorläuferproteins sowie der SU-Domäne zweifelsfrei nachgewiesen werden (Abb.35A, Spur 1, 3-5, 7, 8).

Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass bei der K18 Mutante ein Defekt in der Proteinprozessierung sowie im Transport des Proteins an die Oberfläche vorliegt. Ob dieser Transportdefekt jedoch durch die ineffiziente Prozessierung auftritt, oder die Prozessierung nicht stattfindet aufgrund einer fehlerhaften intrazellulären Verteilung des Proteins, ist mit diesem Verfahren nicht eindeutig zu klären.

Bei einer Koexpression der foamyviralen Strukturproteine Gag und Pol mit den Hüllproteinmutanten waren in den transfizierten 293T Zellen eine verstärkte Prozessierung und Oberflächenexpression der Env Proteine nachweisbar. Durch eine Detektion mit Streptavidin-HRP konnten ebenso die Vorläuferproteine gp130^{Env} sowie die Prozessierungsprodukte gp80^{SU} und gp48TM nachgewiesen werden (Abb.35B, Spur 1, 3-8, 10). Für die K18 Mutante jedoch sind auch bei gleichzeitiger Expression von PFV Gag und Pol keine Env Prozessierungsprodukte auf der Zelloberfläche zu detektieren (Abb.35B, Spur 6). Die zelluläre Expression der Hüllproteine als auch der Gag Proteine (Abb.35B, Spur 1, 3-8, 10) ist für alle Mutanten mit dem Wildtyp vergleichbar. Der Transport- und Prozessierungsdefekt der K18 Mutante kann ebenfalls nicht durch die Koexpression von Gag und Pol aufgehoben werden (Abb.35B, Spur 6).

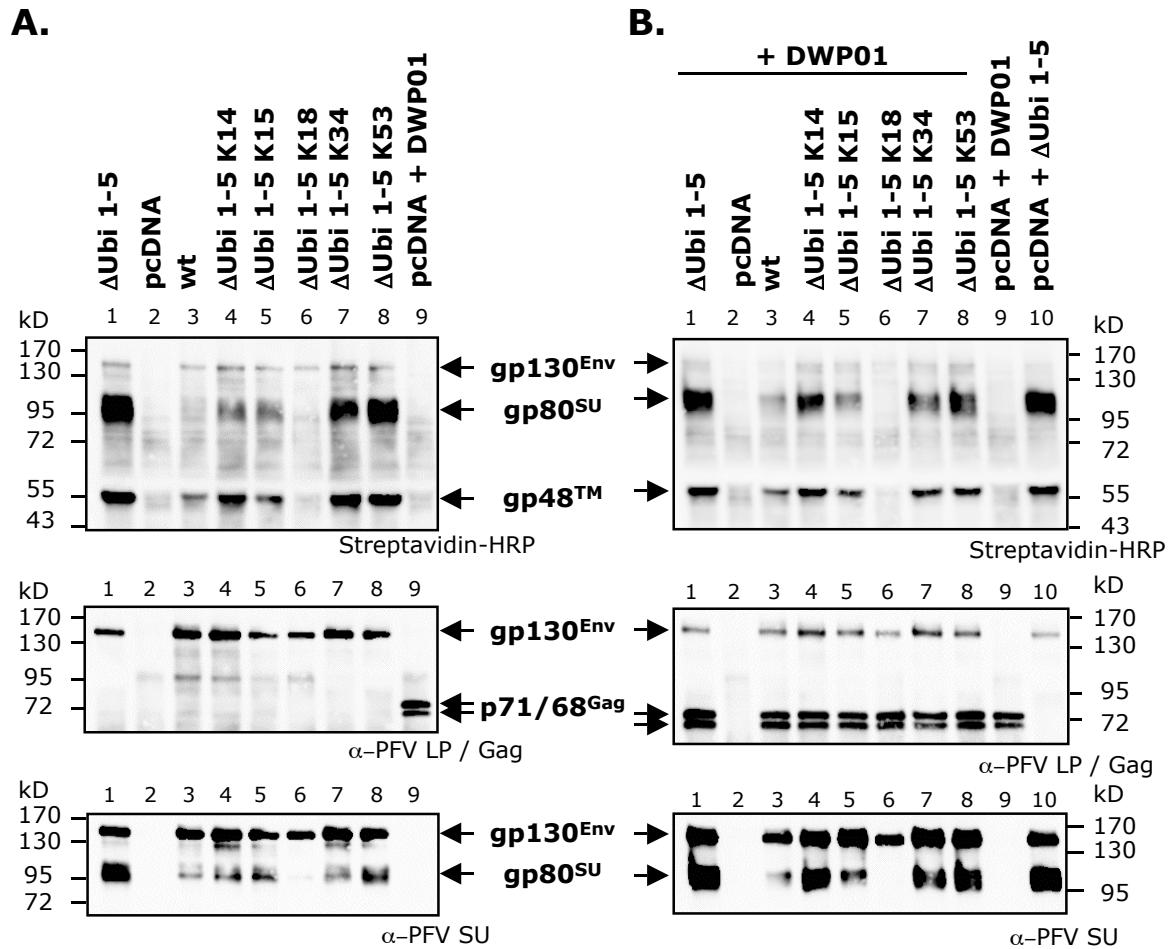


Abbildung 35: Oberflächenbiotinylierung ausgewählter Lysin-Mutanten

293T Zellen wurden nach einer Ca_2PO_4 Transfektion induziert und Proteine auf der Zelloberfläche selektiv mit Biotin markiert. Nach einer Immunopräzipitation und einem Western Blot wurden die auf der Oberfläche der transfizierten Zellen exprimierten Proteine mit Straptavidin-HRP detektiert. Die zelluläre Gesamt-Proteinexpression wurde durch Detektion mit Anti-PFV LP 1-86 und Anti-PFV Gag 936 (polyklonale Hasenserien), sowie Anti-PFV SU P3E10 (Hybridomaüberstand) ermittelt. Zellen wurden mit Env-Expressionsplasmiden alleine (**A**), oder mit einem Gag/Pol-exprimierenden PFV Vektor kotransfiziert (**B**). ΔUbi 1-5: pczHFVenvEM140, pcDNA: pcDNA3.1zeo, wt: pczHFVenvEM002, ΔUbi 1-5 K14: pczHFVenvEM145, ΔUbi 1-5 K15: pczHFVenvEM146, ΔUbi 1-5 K18: pczHFVenvEM147, ΔUbi 1-5 K34: pczHFVenvEM148, ΔUbi 1-5 K53: pczHFVenvEM149.

Diese Analysen haben gezeigt, dass die Lysine innerhalb des foamyviralen Leaderpeptides eine wesentliche Rolle bei der Freisetzung subviraler wie auch viraler Partikel spielen. Der Grad der Ubiquitinierung scheint hierbei für die Regulation essentiell zu sein. Im Vergleich zum Wildtyp des PFV Hüllproteins, weist eine Variante (ΔUbi 1-5), bei der die fünf Lysine im LP gegen Arginin ausgetauscht wurden, eine um das Doppelte gesteigerte Freisetzung infektiöser viraler Partikel und um den Faktor 20-50 gesteigerte Freisetzung von SVP auf (Stanke et al., 2005). Diese Proteinmutante wird posttranslational nicht mehr ubiquitiniert. Ein ähnlicher Phänotyp, nur nicht so ausgeprägt, konnte für eine Mutante gezeigt werden, bei welcher die ersten drei Lysine gegen Arginin getauscht wurden. Dies legte die Vermutung nahe, dass die Verteilung und die Anzahl der Lysine, und somit der Grad und die Verteilung der Ubiquitinierung, eine wesentliche Rolle in der Regulation der Freisetzung spielt. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden auf Basis der ΔUbi 1-5 Mutante neue Hüllproteinvarianten hergestellt, die einzelne Lysine an ihren natürlichen

Positionen wieder eingeführt hatten. Darüber hinaus wurden weitere Mutanten hergestellt, bei welchen Lysine an neuen Positionen eingeführt wurden. Mit Ausnahme der Δ Ubi 1-5 K18 Variante setzten alle Mutanten subvirale, wie auch virale Partikel frei. Die Hüllproteine der freigesetzten Partikel waren stets ubiquitiniert. Eine Ausnahme bildet hierbei die K53 Mutante, die nicht ubiquitiniert wird und sich phänotypisch auch sonst nicht von der Δ Ubi 1-5 Mutante unterscheiden lässt. Die Freisetzungsraten der einzelnen subviralen Partikel lagen in einem Bereich zwischen 7% und 168% verglichen mit der Δ Ubi 1-5 Mutante, ähnliches gilt auch für die virale Partikelfreisetzung. Die für die Freisetzung von SVP und Viruspartikeln ermittelten Werte lagen aber stets über denen des Wildtyps. Nur für die Mutante K18 konnte keine Sekretion von Partikeln nachgewiesen werden. Eine weitere Besonderheit dieser Hüllproteinvarinate ist ein zu beobachtender Defekt in der Prozessierung des Vorläuferproteins sowie ein Defekt im Transport an die Zelloberfläche. Dieser ist durch eine Analyse der Oberflächenexpression im Vergleich zu anderen Hüllproteinvarinaten identifiziert worden. Die Einführung eines Lysins an exakt dieser Position hat also einen Einfluß auf die Prozessierung, die intrazelluläre Verteilung und Freisetzung des Proteins. Mit den bislang durchgeführten Versuchen lässt sich jedoch keine Aussage über die intrazelluläre Verteilung von Proteinen treffen. Ob aber diesbezüglich Unterschiede auftreten sollte mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht werden.

3.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

3.3.1 Immunofluoreszenz mit PFV Env-spezifischen Antikörpern

Um die räumliche Verteilung von Proteinen innerhalb einer Zelle zu untersuchen, kann man diese mit Antikörpern färben und mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysieren. Diese Methode ermöglicht es, durch eine Fokussierung in die Probe hinein, deutliche und scharfe Bilder einer Zellebene zu machen. Im Gegensatz zu Auflichtmikroskopen ist das Streulicht zu vernachlässigen, wodurch zelluläre Strukturen stark hervortreten.

Für erste Analysen wurden anhand ihres Phänotyps vier verschiedene Hüllproteinmutanten gewählt, das wildtypische PFV Env, die Δ Ubi 1-5 Mutante und die Mutanten Δ Ubi 1-5 K18 und Δ N8, letztere aufgrund ihres Transportdefektes. Ein aus Hybridomaüberständen gewonnener Antikörper (α -PFV SU P3E10) diente zur Detektion der foamyviralen Hüllproteine. Die sekundären Antikörper waren mit Alexa Farbstoffen geeigneter Wellenlängen gekoppelt.

Für die erste Versuchsreihe, die dazu dienen sollte herauszufinden wie gut sich PFV Env in den transfizierten Zellen mit besagten Antikörpern nachweisen lässt, wurden HT1080 Zellen mit Eugene transfiziert (Kap. 2.4.3.3). Die Fixierung der Zellen sowie deren Färbung erfolgte 48h nach Transfektion (Kap. 2.7.2). Die Zellen wurden mit Moviol auf Objektträgern fixiert und bis zur Analyse bei 4°C im Dunkeln gelagert. Die Proben wurden mit dem LSM 510 konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss) analysiert und die Bilder mit der „open-source“-Software ImageJ (www.imagej.com) ausgewertet.

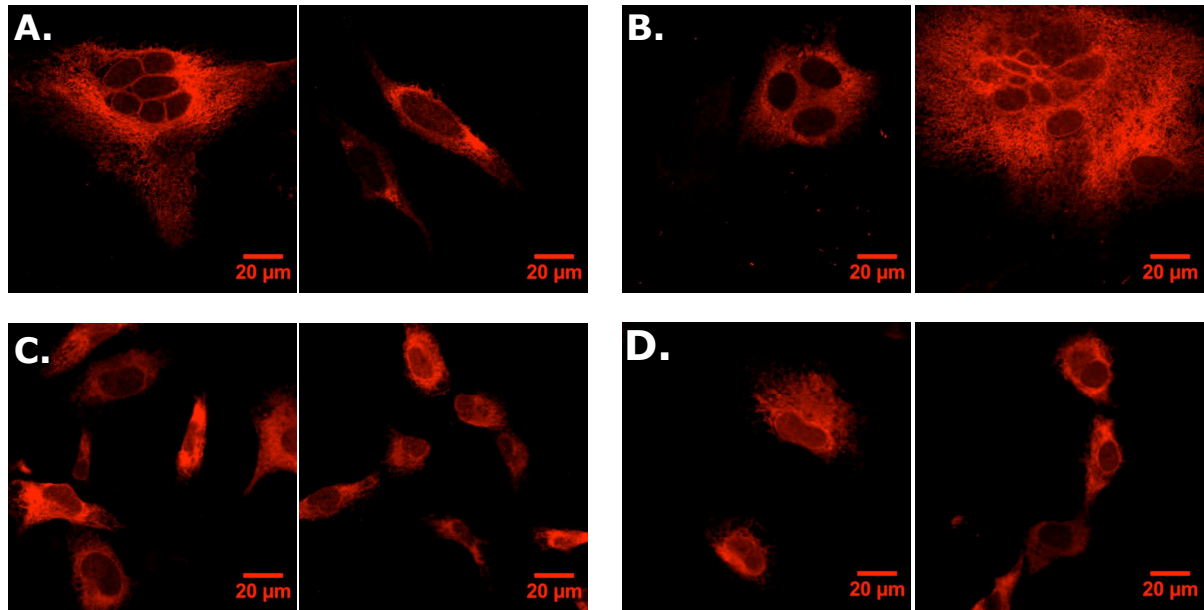


Abbildung 36: Immunofluoreszenz Env-transfizierter HT1080 Zellen

HT1080 Zellen wurden mit Fugene transfiziert. Für jedes Env-Expressionsplasmid wurden 2 µg DNA verwendet. 48h p.T. wurden sie fixiert und gefärbt. Primärer Antikörper: Anti-PFV SU P3E10 [1:5] (Hybridomaüberstand), Sekundärer Antikörper: Anti-Maus Alexa 546 [1µg/ml] (Invitrogen). **(A):** pczHFVenvEM002 (wt), **(B):** pczHFVenvEM140 (Δ Ubi 1-5), **(C):** pczHFVenvEM147 (Δ Ubi 1-5 K18), **(D):** pczHFVenvEM109 (Δ N8).

Wie in Abb.36 ersichtlich, ließen sich in allen transfizierten Zellen PFV Env Proteine spezifisch nachweisen. Die Fluoreszenzintensität variierte jedoch sehr stark innerhalb der Proben. Für das wildtypische Hüllprotein (Abb.36A), sowie die Δ Ubi 1-5 Mutante (Abb.36B) ist die Bildung von vielkernigen Riesenzellen (Synzytia) gut zu erkennen, wohingegen bei den Mutanten K18 und Δ N8 (Abb.36C & D) stets nur vereinzelte Zellen angefärbt sind. Dies weist erneut auf einen Transportdefekt der Mutanten hin, da für die Bildung von Synzytia die Hüllproteine in die Plasmamembran gelangen müssen. Bei der intrazellulären Verteilung der Proteine lassen sich keine eindeutigen Unterschiede zwischen den Mutanten und dem Wildtyp feststellen. Die Signale erscheinen am stärksten in einer Region um den Zellkern herum (Abb.36A-D) und das Muster ähnelt dem einer Färbung des endoplasmatischen Reticulums (ER) (vgl. Abb. 40).

Diese ersten Untersuchungen bestätigen den Phänotyp der Mutante Δ Ubi 1-5 K18 und der NGS Mutante Δ N8 in Bezug auf ihre Proteinprozessierung und den intrazellulären Transport durch die fehlende Bildung von Riesenzellen. Aber die sehr stark variierende Fluoreszenzintensität innerhalb und zwischen den einzelnen Proben erschwert eindeutige Aussagen.

3.3.2 Zeitverlaufsversuch zur besseren Env-Detektion in transfizierten Zellen

Eine niedrige oder stark schwankende Intensität bei einer Immunofluoreszenz kann an einem heterogenen Expressionsmuster der transfizierten Zellen liegen, oder an einem falsch gewählten Zeitpunkt nach einer Transfektion. Um den optimalen Zeitpunkt für eine Analyse

im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop zu finden, wurde ein Zeitverlaufsexperiment durchgeführt (Abb.37).

Dazu wurden HT1080 Zellen mit je 200ng des entsprechenden Env Expressionsplasmids transfiziert (Kap. 2.4.3.3) und die Zellen zu bestimmten Zeitpunkten nach der Transfektion fixiert (Kap. 2.7.2). Nach der Fixierung der Zellen wurden diese in Waschpuffer bei 4°C gelagert, damit die Antikörperfärbungen für alle Proben gleichzeitig durchgeführt werden konnten.

Die Auswertung erfolgte mit dem LSM 510 konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss) und der „open-source“-Software ImageJ (www.ImageJ.com).

Für diese Färbungen wurden die gleichen Env-Mutanten wie in Kapitel 3.3.1 verwendet. Exemplarisch dargestellt sind die Ergebnisse der Δ Ubi 1-5 K18 Mutante (Abb.37).

Zwölf Stunden nach Transfektion sind noch keine Env spezifischen Signale nachzuweisen (Abb.37A). Bereits 6h später, 18h nach Transfektion, sind erste gefärbte Zellen zu erkennen (Abb.37B). Die Färbung erscheint jedoch ziemlich schwach und ist sehr inhomogen bezogen auf die gesamte Zellpopulation. Nach 24h ist kein wesentlicher Unterschied zu den Zellen, die nach 18h fixiert wurden, erkennbar (Abb.37C). Die Zellen fluoreszieren relativ schwach und es sind noch viele nicht leuchtende Zellen, oder solche mit geringerer Fluoreszenzintensität zu erkennen. Eine relativ starke Fluoreszenz ist erst nach 48h zu beobachten (Abb.37D). In einzelnen Fällen noch stärker fluoreszieren die Zellen nach 72h (Abb.37E). Zu diesem Zeitpunkt weist aber der Zellrasen schon erhebliche Löcher auf und die Morphologie der einzelnen Zellen scheint im Vergleich zu früheren Stadien starken Veränderungen zu unterliegen.

Die Zellkerne erscheinen in dieser Abbildung durch eine Färbung mit DAPI blau. Dieser Farbstoff markiert selektiv DNA, weshalb man innerhalb Zelle auch Reste der transfizierten DNA anfärbt und diese als blaue Flecken zu erkennen sind (Abb.37A-E).

Diese Ergebnisse führen zu dem Schluß, dass eine Detektion transfizierter Proteine durch Immunofluoreszenz stark zeitabhängig ist. Während nach 12h oder 18h noch keine nennenswerte Fluoreszenz zu beobachten ist, scheinen die späteren Zeitpunkte für eine Analyse im Mikroskop gut geeignet zu sein. Die Fluoreszenzintensität nach 72h ist sehr hoch, doch in diesem Stadium beginnen die Zellen bereits abzusterben. Ein Zeitpunkt zwischen 24h und 48h scheint am besten für eine Analyse zu sein, da bei diesen Proben die Balance zwischen Leuchtintensität und intakter Zellmorphologie am ehesten gegeben ist.

Allgemein jedoch ist die Fluoreszenzintensität relativ gering, vergleicht man diese mit einer DAPI-Färbung oder der Intensität eines GFP-markierten Proteins (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund dieses relativ schlechten Nachweises des Hüllproteins wurden verschiedene Optimierungsversuche durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Transfizierte HT1080 Zellen wurden 24h nach der Transfektion mit Na-Butyrat induziert, um die Aktivität des CMV-Promotors noch zu steigern. Damit konnten keine Erfolge erzielt werden, denn die Zellen starben aufgrund dieser Behandlung ab. Des Weiteren wurden transfizierte Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der primären wie sekundären Antikörper gefärbt, um die unspezifische Hintergrundfluoreszenz weitestgehend zu reduzieren.

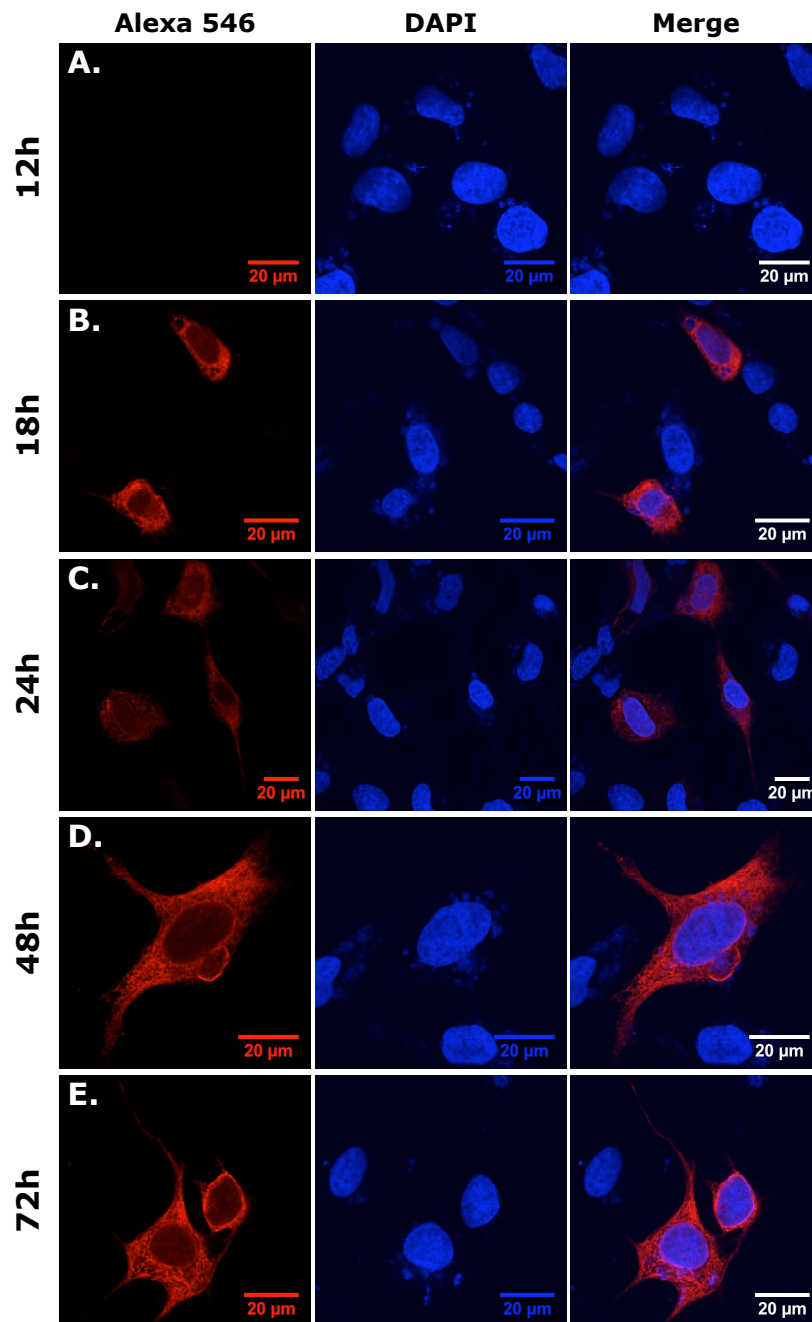


Abbildung 37: Zeitverlaufsexperiment zur Detektion von PFV Env

HT1080 Zellen wurden mit Fugene transfiziert. Die Fixierung der Zellen erfolgte nach (A): 12h, (B): 18h, (C): 24h, (D): 48h und (E): 72h p.T. Primärer Antikörper: Anti-PFV SU P3E10 [1:5] (Hybridomaüberstand), sekundärer Antikörper: Anti-Maus Alexa 546 [1µg/ml] (Invitrogen). Pro Transfektion wurden 200ng pczHFVenvEM147 (Δ Ubi 1-5 K18) und 1,8µg pcDNA3.1zeo verwendet. Merge: Überlagerung aller Farbkanäle.

Durch eine Variation beider Parameter, d.h. Zeit und Antikörperkonzentration, konnten zwar geringe Verbesserungen bei der Detektion erzielt werden, doch war die Gesamtfluoreszenz in den meisten Fällen dennoch zu niedrig und zu inhomogen, um gesicherte Aussagen über die intrazelluläre Verteilung des PFV Hüllproteins machen zu können. Eine mögliche Erklärung wäre, dass der Antikörper das in den Zellen exprimierte PFV Env nur schlecht erkennt, oder zumindest bestimmte konformationelle Varianten nur mit sehr geringen Effizienz zu binden vermag. Ein Befund der diese Vermutung stützt ist, dass

bei keinem der durchgeführten Versuche je eine Färbung der Plasmamembran zu erkennen war. Auch wenn man davon ausgeht, dass nur ein geringer Teil des in einer Zelle vorliegenden Proteins in der Zellmembran eingelagert vorliegt, sollte zumindest eine schwache Färbung dieser Zellstruktur zu erkennen sein.

3.3.3 Immunofluoreszenzanalysen fluorochrom-gekoppelter PFV Hüllproteine

Um der Vermutung Rechnung zu tragen, dass der bislang verwendete PFV SU-spezifische Antikörper nicht alle Formen des Hüllproteins bindet, wurden in unserem Labor PFV Hüllproteinmutanten hergestellt, die an ihrem N-Terminus ein rot fluoreszierendes Protein (mCherry) fusioniert tragen (Stirnnagel, unveröffentlicht). Diese sollten im besten Fall ein dem wildtypischen PFV Hüllprotein ähnliches Verteilungsmuster in den transfizierten Zellen zeigen. Diese Cherry-Env Fusionsmutanten ermöglichen bei paralleler Detektion mit dem SU spezifischen Antikörper eine Aussage über dessen Bindungsfähigkeit. Für diese Versuche wurde ein Maus-spezifischer sekundärer Antikörper verwendet, der stabil mit dem Alexa 488 Farbstoff gekoppelt ist.

Die hergestellten Fusionsproteine entsprechen dem wildtypischen Hüllprotein (Cherry-wt), der Δ Ubi 1-5 Mutante (Cherry- Δ Ubi 1-5), der SU/TM-Spaltstellenmutante pczHFVenvEM020 (Cherry-SU/TM), der Δ Ubi 1-5 K18 Mutante (Cherry-K18) und einer Kombinationsmutante aus der Δ Ubi 1-5 K18 und der SU/TM-Spaltstellenmutante (Cherry-K18+SU/TM).

Für diesen Versuch wurden HT1080 Zellen mittels Fugene transfiziert (Kap. 2.4.3.3). Pro PFV Env-Mutante wurden 1 μ g Plasmid-DNA zusammen mit 1 μ g pcDNA3.1zeo in die Zellen eingebracht. Nach 24h wurde das Medium gewechselt und die Zellen nach einem weiteren Tag fixiert und gefärbt (Kap. 2.7.2). Die Proben wurden mit dem LSM 510 konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss) analysiert und die Bilder mit der „open-source“-Software ImageJ (www.ImageJ.com) ausgewertet.

Die Eigenfluoreszenz der mit Cherry fusionierten Hüllproteinvarianten liefern, wie erwartet, ein deutlich stärkeres Signal im Vergleich zur Detektion mit einem Antikörper (Abb.38A-E Cherry). Die Proteine sind nicht nur in einer Zellkern nahen Region zu beobachten, sondern über die gesamte Zelle verteilt. Darüber hinaus lassen sich mit diesen Fusionsproteinen auch indirekt die Plasmamembranen anfärben, was für eine Einlagerung der PFV Env-Proteine in diese spricht. Die einzelnen Fusionsproteine zeigen keine wesentlichen Unterschiede in der intrazellulären Verteilung.

Bei allen Mutanten erscheint die Fluoreszenzintensität in der Region des Zellkerns am höchsten. Mit dem SU-spezifischen Antikörper erschienen die Signale meist deutlich schwächer (Abb.38A-E Alexa 488). Die Verteilung beschränkt sich meist auf eine Kern-nahe Region, vergleichbar mit Abb.36. Auch haben sich keine Hüllproteine in den Plasmamembranen anfärben lassen. Die DAPI-Färbung visualisiert die in der Zelle befindliche DNA (Abb.38A-E DAPI). Neben den Zellkernen erscheinen noch Reste der transfizierten Plasmid-DNA als Punkte.

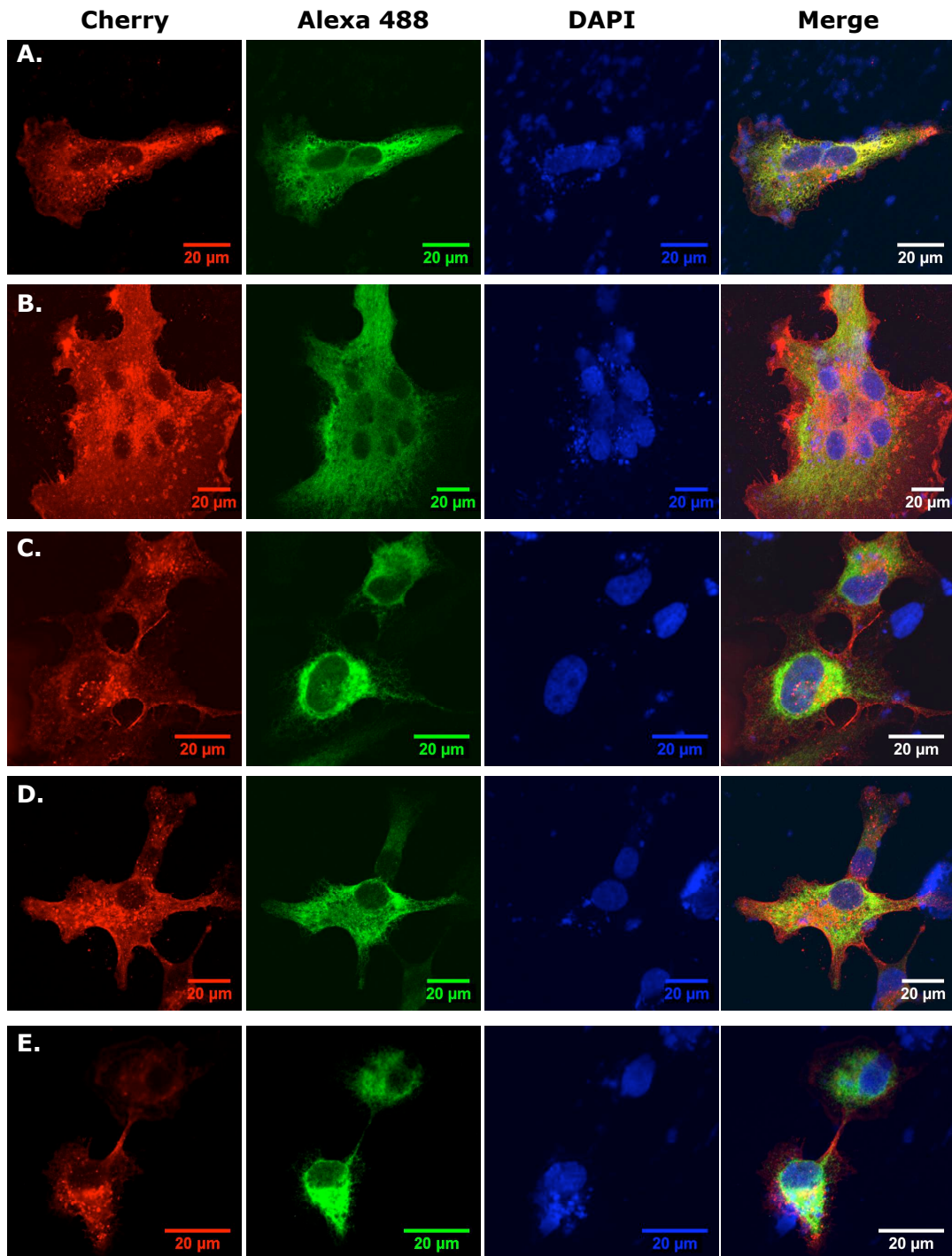


Abbildung 38: Immunofluoreszenz Cherry-markierter Env-Mutanten

HT1080 Zellen wurden Fugene transfiziert und 48h p.T. fixiert und gefärbt. Von jedem Env-Expressionsplasmid wurden 1μg Plasmid-DNA mit 1μg pcDNA3.1zeo transfiziert. **(A)**: Cherry-wt (pczHFVenvEM238), **(B)**: Cherry-ΔUbi 1-5 (pczHFVenvEM236), **(C)**: Cherry-SU/TM (pczHFVenvEM240), **(D)**: Cherry-K18 (pczHFVenvEM242), **(E)**: Cherry-K18+SU/TM (pczHFVenvEM243). Merge: Überlagerung aller Farbkanäle.

Diese Befunde stützen die Annahme, dass der bislang verwendete SU-spezifische Antikörper nicht alle in der Zelle befindlichen PFV Env-Proteine zu detektieren vermag. Ein starkes Signal detektiert man fast ausschließlich in einer Region um den Zellkern herum, was möglicherweise für eine Lokalisation des Proteins im ER spricht, weitere konformationelle Formen des Hüllproteins scheinen dagegen nicht, oder nur relativ ineffizient

gebunden zu werden. Die mit einem Cherry-Protein fusionierten Hüllproteine hingegen lassen sich in der gesamten Zelle nachweisen, mit Schwerpunkt um den Zellkern herum. Im Gegensatz zur Detektion mit Antikörpern auch in der Plasmamembran, was den Schluß nahe legt, dass man auf diesem Wege das gesamte in der Zelle exprimierte Protein nachweisen kann.

3.3.4 Zeitverlaufsexperiment zur Detektion der Cherry-markierten Env-Proteine

Die Fluoreszenzintensität der mit Cherry-markierten Hüllproteine erscheint deutlich höher als bei einer Detektion der Proteine mit einem spezifischen Antikörper. Der optimale Zeitpunkt für eine Analyse der transfizierten Zellen sollte im folgenden Versuch ermittelt werden. Der Versuch wurde mit allen Cherry-Konstrukten sowie einem Gag-Protein, das C-terminal ein fusioniertes eGFP trägt, durchgeführt.

Hierfür wurden HT1080 Zellen mittels Fugene transfiziert (Kap. 2.4.3.3). Die transfizierten Zellen wurden nach 8h, 16h, 24h und 48h gewaschen und fixiert (Kap. 2.7.3). Die DNA-Färbung mit DAPI erfolgte für alle Proben zeitgleich. In Abb.39 sind exemplarisch Proben der wildtypischen und der Δ Ubi 1-5 Cherry-Fusionsproteine, sowie dem Gag-GFP Fusionsprotein dargestellt.

Nach 8h war bei den Proben der Cherry-fusionierten Hüllproteinvarianten nur vereinzelt und sehr schwach eine Fluoreszenz zu identifizieren (Abb.39A, B 8h). Nach 16h jedoch war in allen Proben eine deutliche Expression des Proteins nachzuweisen, wenn auch das Expressionsmuster innerhalb der Proben sehr heterogen war (Abb.39A, B 16h).

Manche Zellen fluoreszierten stark, manche weniger stark und bei einer erheblichen Anzahl an Zellen war keine Fluoreszenz zu beobachten. Die Fluoreszenzintensität war nach 24h am höchsten (Abb.39A, B 24h). Proben, die zu diesem Zeitpunkt fixiert wurden, zeigten das homogenste Expressionsmuster, gepaart mit einem intakten Zellrasen. Die Bildung von Synzytia ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht zu weit fortgeschritten und einzelne, nicht fusionierte Zellen besitzen subjektiv beurteilt eine normale Zellmorphologie. Eine leichte Abnahme der Fluoreszenzintensität war in den Proben 48h nach der Transfektion zu beobachten (Abb.39A, B 48h). Obgleich die Anzahl der fluoreszierenden Zellen zu diesem Zeitpunkt am höchsten ist, sinkt die Leuchtintensität der einzelnen Zellen. Das liegt unter anderem an der Bildung vieler Synzytien, die stets weniger stark fluoreszieren.

Ein etwas anderer Befund lässt sich für das transfizierte Gag-Protein feststellen (Abb.39C). Bereits 8h nach Transfektion konnte eine gute Gag-GFP Expression beobachtet werden (Abb.39C 8h). Die Zeitpunkte 16h und 24h nach Transfektion unterschieden sich in dem Expressionsmuster des Fusionsproteins nicht merklich voneinander (Abb.39C 26h, 24h). Interessanterweise konnte zu diesen Zeitpunkten meist kein oder nur sehr selten PFV Gag in den Zellkernen der transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war bei den Proben nach 48h eine deutliche Kernlokalisierung des foamyviralen Kapsidproteins zu beobachten (Abb.39C 48h). Das allgemeine Expressionsmuster von Gag unterschied sich zusätzlich stark von dem des Hüllproteins. War dieses meist über die gesamte Zelle verteilt, konzentrierte sich das Gag-Protein in punktförmigen Aggregaten um den Zellkern herum.

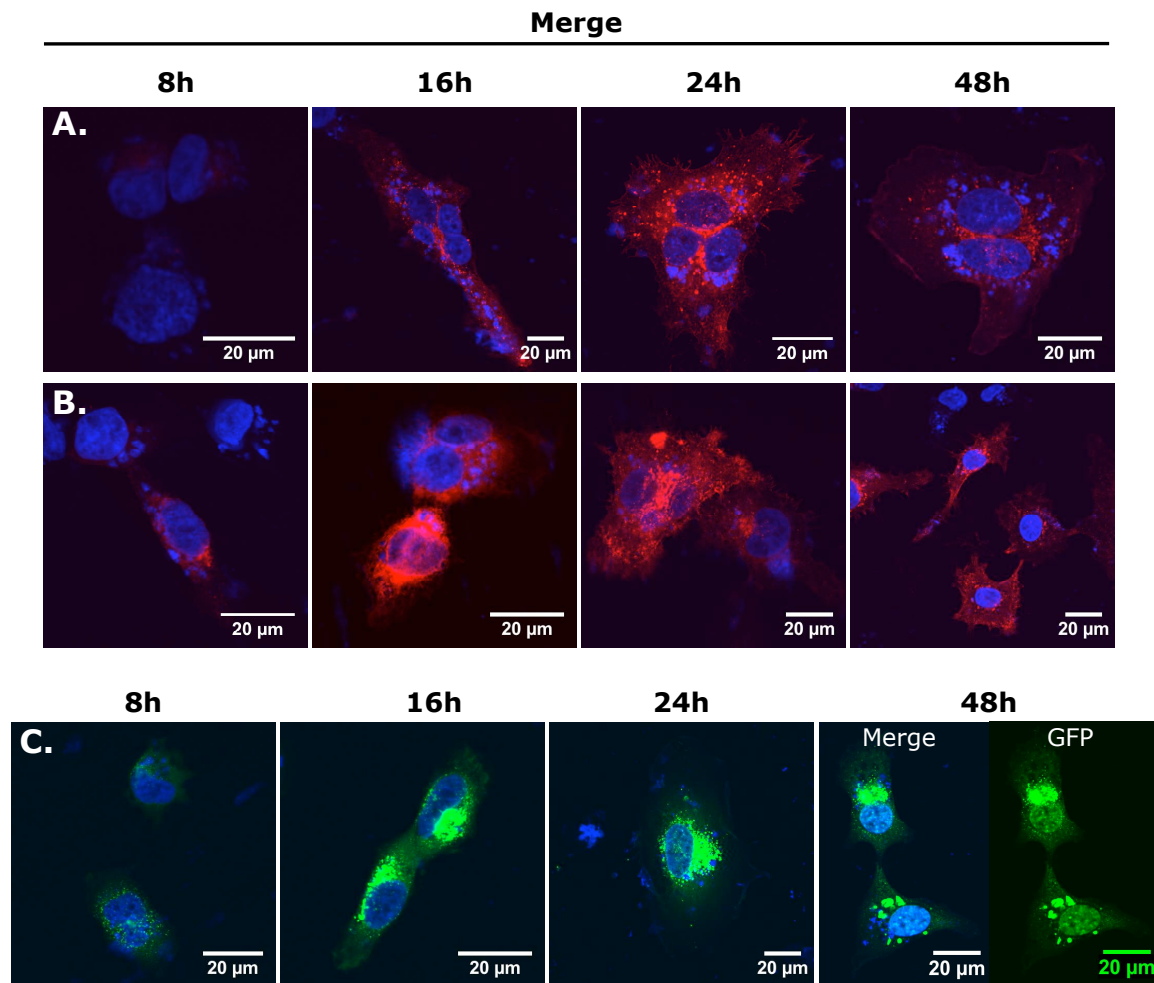


Abbildung 39: Zeitverlaufsexperiment zur Detektion der Cherry-markierten PFV Hüllproteine

HT1080 Zellen wurden mit Fugene transfiziert. Die Fixierung der Zellen erfolgte nach 8h, 16h, 24h und 48h p.T. Von jedem Env-Expressionsplasmid wurden 1μg Plasmid-DNA zusammen mit 1μg pcDNA3.1zeo, bzw. 400ng Plasmid-DNA des Gag-Expressionsplasmids mit 1,6μg pcDNA3.1zeo transfiziert. **(A)**: Cherry-wt (pczHFVenvEM238), **(B)**: Cherry-ΔUbi 1-5 (pczHFVenvEM236), **(C)**: Gag-GFP (pGag 1-648CGFPHH). Merge: Überlagerung aller Farbkanäle.

Die mit Cherry-markierten PFV Hüllproteinvarianten transfizierten Zellen zeigten 24h nach Transfektion die höchste Fluoreszenzintensität bei einer noch weitestgehend intakten Zellmorphologie. Deshalb wurden bei den folgenden Versuchen die Zellen einen Tag nach Transfektion fixiert und gefärbt.

3.3.5 Kolokalisationsuntersuchungen mit zellulären Kompartiment-markern

Virale Glykoproteine erfahren während ihrer Reifung mehrere posttranslationale Modifikationen wie beispielsweise Glykosylierungen oder Ubiquitinierungen. Dies kann in zellulären Kompartimenten wie dem endoplasmatischen Reticulum (ER) und dem Golgi-Apparat geschehen. Es ist beschrieben worden, dass beispielsweise Glykosylierungen Teil eines „Qualitätsmanagement“ sind, mit dessen Hilfe eine richtige Konformation eines Proteins erkannt werden kann. Abhängig von der exponierten Zuckergruppe kann dann ein

Weitertransport des Proteins verhindert oder gefördert werden (Hurtley und Helenius, 1989; Brewer und Corley, 1996; Nauseef, 1999). Auch Ubiquitinierungen haben einen Einfluß auf den intrazellulären Transport von Proteinen. So können sie verstärkend auf die Endozytose membranständiger Proteine wirken (Shih et al., 2000), oder durch die Bildung von Multiubiquitinketten ein Protein dem lysosomalen Abbauweg zuführen. Mutationen in der Aminosäuresequenz von Proteinen können deren Prozessierung und Transport innerhalb der transfizierten Zelle beeinflussen. So zeigt die Δ Ubi 1-5 Mutante in biochemischen Analysen eine sehr starke Prozessierung in ihre Untereinheiten LP, SU und TM, sowie eine massive Freisetzung subviraler Partikel. Die Untereinheiten SU und TM sind auch im Vergleich mit dem wildtypischen Env-Protein gut auf der Oberfläche nachzuweisen, was wahrscheinlich auch die Grundlage für die starke Induktion von Synzytia in einer Zellkultur ist. Die Wiedereinführung eines Lysins an der natürlichen Aminosäureposition 18 führt zu einem stark von der Δ Ubi 1-5 Mutante abweichendem Phänotyp. Für diese Mutante ist weder eine Freisetzung subviraler noch viraler Partikel zu beobachten gewesen, noch gelangten prozessierte Env Untereinheiten an die Oberfläche transfizierter Zellen. Die Prozessierung scheint, genauso wie der intrazelluläre Transport, durch diese Mutation gravierend beeinträchtigt zu sein.

Färbt man intrazelluläre Strukturen oder Kompartimente kann man durch Kotransfektion mit einem anderen fluoreszierenden Protein eine Aussage über deren räumliche Verteilung und Kolokalisation innerhalb der Zelle treffen. Zum Anfärben zellulärer Kompartimente wurden mit autofluoreszierenden Proteinen fusionierte Varianten von Rab7 und Rab5 als Marker für späte und frühe Endosomen, sowie VLP18 als ER-Marker und ein Golgi-Marker (N-terminale 81 AS der humanen beta 1,4-Galactosyltransferase) verwendet.

3.3.5.1 Kotransfektion der Cherry-Env Konstrukte mit VLP18-GFP

Für Foamyviren ist beschrieben worden, dass sie zumeist in intrazelluläre Kompartimente knospen und nur in geringerem Maße über die Plasmamembran (Goepfert et al., 1997; Lindemann et al., 1998; Lindemann et al., 1999). Als Kompartiment für die Knospung wird das endoplasmatische Reticulum vorgeschlagen, ein Ort für die Synthese und Reifung von Proteinen, welcher um den Zellkern und in weiten Bereichen einer Zelle lokalisiert ist. Das foamyvirale Hüllprotein besitzt an seinem C-terminalen Ende ein ER-Retrieval-Signal was eine Retention des Proteins im ER bewirkt (Goepfert et al., 1995; 1997; 1999). Um Unterschiede in der intrazellulären Verteilung und Defekte im Transport der Proteine an die Zelloberfläche genauer nachweisen zu können, wurden die Cherry-markierten Env-Proteine, zusammen mit einem ER-spezifischen Marker in HT1080 Zellen koexprimiert. Als ER-Marker diente ein mit GFP fusioniertes VLP18-Protein, dass ausschließlich im ER exprimiert wird (Rolls und Rapoport, 1999). Durch eine Überlagerung der einzelnen Farbkanäle sollte dann eine Aussage über eine eventuelle Kolokalisation möglich sein. Gelbe Strukturen ergeben sich aus der Überlagerung des grünen mit dem roten Kanal und dienen als Maß für eine Koexpression zweier Proteine im gleichen Zellkompartiment.

HT1080 Zellen wurden wie in Kap. 2.4.3.3 beschrieben mit Fugene transfiziert. Nach 24h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen fixiert und anschließend DAPI-gefärbt (Kap. 2.7.3). Die Analyse erfolgte unter einem LSM 510 konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss) und die Bilder wurden mit ImageJ ausgewertet.

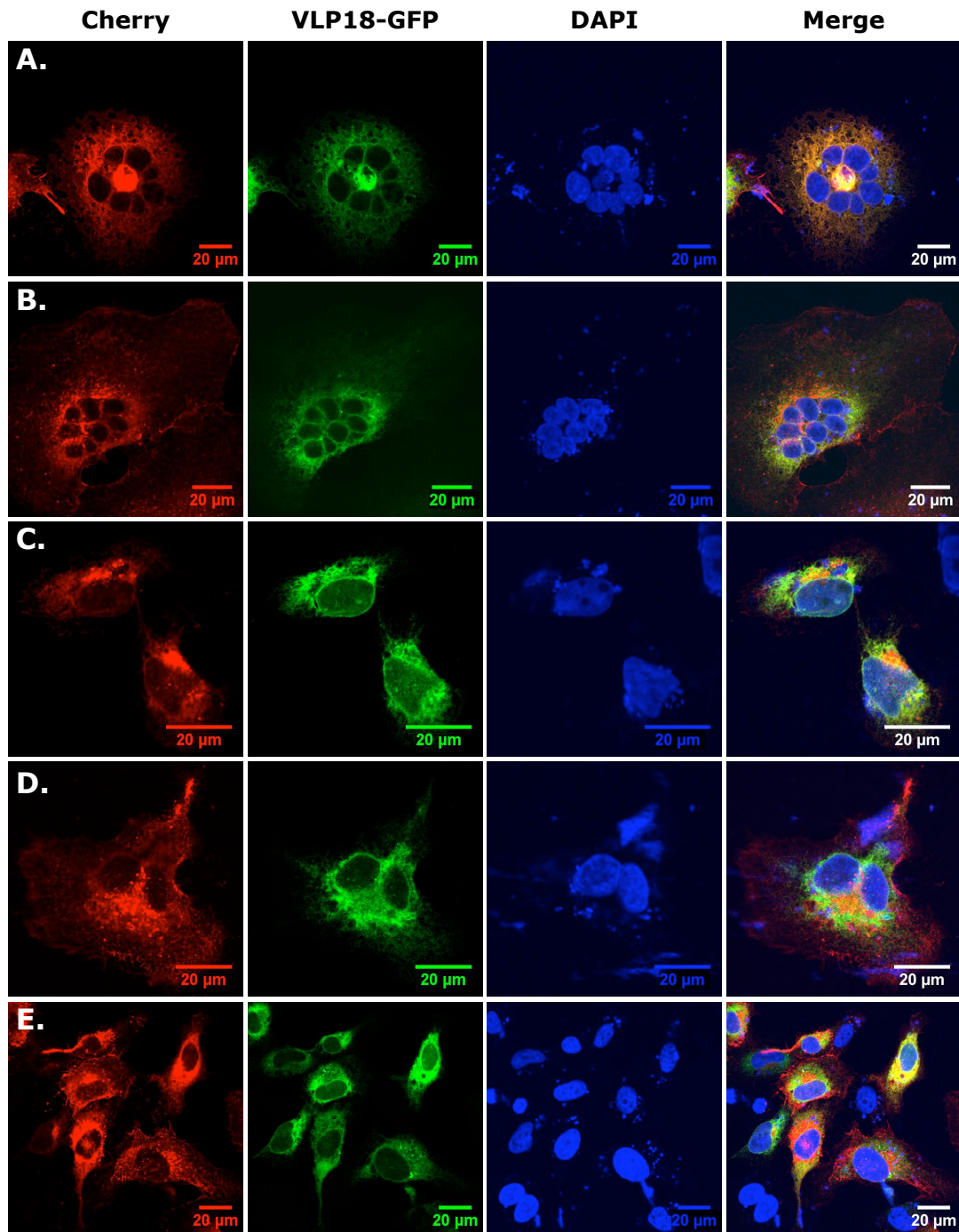


Abbildung 40: Kolokalisationsanalyse Env/ER

HT1080 Zellen wurden mit Eugene transfiziert. Fixierung und Färbung erfolgte 24h p.T. Pro Transfektion wurden 1µg der entsprechenden Env Plasmid-DNA, 0,5µg pVLP18-GFP und 0,5µg pcDNA3.1zeo kotransfiziert. **(A)**: Cherry-wt (pczHFVenvEM238), **(B)**: Cherry-ΔUbi 1-5 (pczHFVenvEM236), **(C)**: Cherry-SU/TM (pczHFVenvEM240), **(D)**: Cherry-K18 (pczHFVenvEM242), **(E)**: Cherry-K18+SU/TM (pczHFVenvEM243). Merge: Überlagerung aller Farbkanäle.

Für alle Cherry-Env Fusionsproteine konnte eine Kolokalisation mit dem endoplasmatischen Reticulum nachgewiesen werden (Abb.40A-E). Das auf dem wildtypischen PFV Env basierende Konstrukt (Abb.40A) scheint gänzlich im ER lokalisiert zu sein, was man an der Überlagerung der roten Env-spezifischen Signale und des grünen ER-marker Signals erkennen kann. Das Aggregat zwischen den Zellkernen, in welchem beide

Proteine lokalisiert sind, könnte aufgrund der relativ starken Synzytiabildung entstanden und vom ER abgeleitet sein. Das von der Δ Ubi 1-5 Mutante abgeleitete Fusionskonstrukt zeigt eine partielle Kolokalisation beider Signale in der Nähe des Zellkerns (Abb.40B), aber auch deutlich Bereiche, in welchen die Signale sich nicht überlagern. Es sind ER-Bereiche vorhanden, in welchen kein Env-Protein eingelagert ist. Die Cherry-Env Mutante, die auf der Hüllproteinvariante mit der defekten SU/TM-Spaltstelle beruht zeigt eine dem wildtypischen Env ähnliche Verteilung (Abb.40C). Die Kolokalisation mit dem ER erscheint nahezu vollständig, wenn auch eine Konzentration der Hüllproteine um den Zellkern zu sehen ist. Die Cherry-K18 Env-Variante hingegen (Abb.40D) ähnelt in ihrem Verteilungsmuster der Cherry- Δ Ubi 1-5 Mutante. Neben Bereichen mit deutlicher Kolokalisation kann man erneut ER-Regionen erkennen, in welchen keine Hüllproteine lokalisiert sind. In der Peripherie der Zellen sind Bereiche, in denen praktisch nur Signale des Hüllproteins zu sehen sind. Die Cherry-K18+SU/TM Mutante (Abb.40E) ist in ihrem Verteilungsmuster nicht von der entsprechenden fusionierten K18-Variante zu unterscheiden.

Die Fusionsmutanten, die keine Lysin-Aminosäureaustausche tragen, scheinen nahezu im gesamten ER lokalisiert zu sein. Bei den Mutanten mit Arginin zu Lysin-Austauschen kann dagegen eine leicht abweichende Verteilung beobachtet werden. Diese Fusionsproteine sind zwar auch stark im ER lokalisiert, aber die Env-Mutanten lassen sich auch ausserhalb des ER nachweisen. Für diese Fusionskonstrukte sind in der Peripherie der transfizierten Zellen verstärkt punktuelle Aggregate zu erkennen.

3.3.5.2 Kotransfektion der Cherry-Env Konstrukte mit pGolgi-YFP

Viele Proteine, die in das endoplasmatische Reticulum synthetisiert werden, gelangen während oder nach ihrer Reifung in den Golgi-Apparat und von dort in das Trans-Golgi-Netzwerk. Dieses Zellkompartiment dient unter anderem dem intrazellulären Transport der Proteine an ihren Bestimmungsort. Das foamyvirale Hüllprotein gelangt nach seiner Synthese und Reifung an die Plasmamembran infizierter oder transfizierter Zellen. Außerdem geht man von einem Knospungsprozess viraler und subviraler PFV Partikel über intrazelluläre Membranen aus. Eine Kolokalisation des PFV Env mit dem ER ist bereits gezeigt worden (Kap. 3.3.5.1). Daher erscheint es wahrscheinlich, dass die Hüllproteine vom ER in den Golgi-Apparat gelangen und dort in die entsprechenden Transportwege sortiert werden. Für die Visualisierung des Golgi-Apparates wurde ein Fusionsprotein verwendet, welches aus den N-terminalen 81 Aminosäuren der humanen beta 1,4-Galactosyltransferase und dem fluoreszierenden YFP besteht.

HT1080 Zellen wurden mit Fugene transfiziert (Kap. 2.4.3.3) und nach 24h fixiert sowie DAPI gefärbt (Kap. 2.7.3). Die gefärbten Zellen wurden mit dem LSM 510 konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss) und der ImageJ-Software analysiert und ausgewertet.

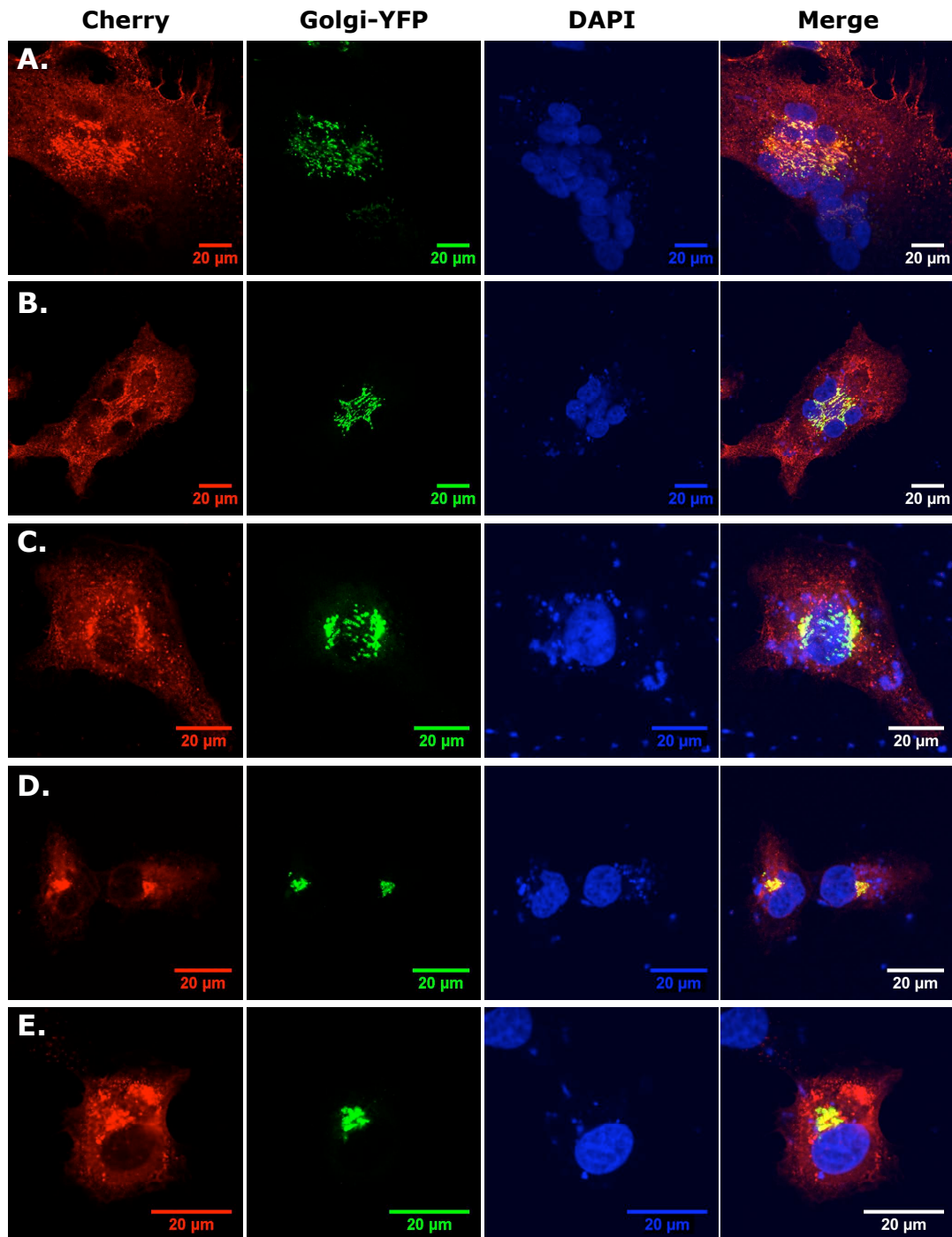


Abbildung 41: Kolokalisationsanalyse Env/Golgi

HT1080 Zellen wurden mit Fugene transfiziert. Fixierung und Färbung erfolgte 24h p.T. Pro Transfektion wurden 1μg der entsprechenden Env Plasmid-DNA, 50ng pGolgi-YFP und 1μg pcDNA3.1zeo kotransfiziert. **(A):** Cherry-wt (pczHFVenvEM238), **(B):** Cherry-ΔUbi 1-5 (pczHFVenvEM236), **(C):** Cherry-SU/TM (pczHFVenvEM240), **(D):** Cherry-K18 (pczHFVenvEM242), **(E):** Cherry-K18+SU/TM (pczHFVenvEM243). Merge: Überlagerung aller Farbkanäle.

Das Fusionskonstrukt aus dem wildtypischen PFV Env und dem fluoreszierenden Cherry-Protein (Cherry-wt) zeigt eine vollständige Golgi-Färbung (Abb.41A). Das Signal des Golgi-Apparates ist um den Zellkern herum konzentriert und komplett mit dem Env-Signal kolokalisiert. Die Struktur des Golgi-Apparates erscheint nicht zusammenhängend und über einen relativ weiten Bereich ausgedehnt, was wahrscheinlich auf die starke Synzytiabildung

zurückzuführen ist. Eine ebenso deutliche Kolokalisation ist für die Cherry- Δ Ubi 1-5 Variante zu erkennen (Abb.41B). Auch in dieser Probe sind Synzytia zu sehen. Das von der Spaltstellen-Mutante abgeleitete Cherry-Konstrukt (Cherry-SU/TM) induziert keine Fusion von Riesenzellen nach Transfektion, da das Fusionspeptid im 5'-Bereich der TM-Domäne nicht exponiert wird. Daher erscheint der Golgi-Apparat als relativ kompakte Struktur um den Zellkern (Abb.41C). Auch bei dieser Mutante kann man von einer guten Kolokalisation des Golgi-Signals mit der Fluoreszenz des Hüllproteins sprechen. Eine klare Kolokalisation ist bei der Cherry-K18 Mutante nachzuweisen (Abb.41D). Darüberhinaus bestätigt sie ihren bisherigen Phänotyp und induziert keine Synzytia, was wiederum auf einen fehlenden Transport des Proteins an die Zelloberfläche schließen lässt. Die Kombinationsmutante Cherry-K18+SU/TM ist phänotypisch nicht von der entsprechenden K18 Mutante zu unterscheiden (Abb.41E).

So konnte für alle Hüllproteinvarianten eine starke Kolokalisation mit dem Golgi-Apparat gezeigt werden. Alle mit dem pGolgi-YFP nachweisbaren Strukturen waren auch mit dem Signal der Cherry-markierten Hüllproteine zu detektieren. Das führt zu dem Schluß, dass in den transfizierten Zellen alle Golgi-Strukturen PFV Env enthalten, aber nicht alles in der Zelle vorkommende Env im Golgi-Apparat lokalisiert ist.

3.3.5.3 Kotransfektion der Cherry-Env Konstrukte mit Rab5-GFP und Rab7-YFP

Endosomen sind durch Endozytose entstandene intrazelluläre Vesikel. Sie verschmelzen untereinander und mit frühen Endosomen, von welchen aus ein Rücktransport der Inhaltstoffe zur Plasmamembran stattfindet. Das frühe Endosomen-Kompartiment dient als Sortierstelle auf dem Endozytose-Transportweg und ist durch spezifische Proteine wie beispielsweise das G-Protein Rab5 gekennzeichnet. Späte Endosomen besitzen die gesamte lysosomale Enzymausstattung und sind durch die Proteine Rab7 und Rab9 gekennzeichnet. Die Beziehung zwischen frühen und späten Endosomen ist nicht endgültig geklärt. Entweder gehen die frühen in die späten Endosomen über, oder es findet ein Transport zwischen den dauerhaft bestehenden Endosomentypen statt. Ein Transport von Proteinen ist auch zwischen dem Golgi-Apparat und den späten wie auch frühen Endosomen nachgewiesen worden.

Auf dem Weg zur und von der Plasmamembran zurück wären die Endosomen, bzw. vesikuläre Sortierstellen, nach dem Golgi-Apparat der nächste Anlaufpunkt der viralen Glykoproteine. Deshalb wurden die Cherry-Env Fusionsproteine mit Markern für frühe und späte Endosomen, Rab5 und Rab7, kotransfiziert, um eventuelle Unterschiede in der Verteilung über diese Kompartimente nachzuweisen. Der Marker für die frühen Endosomen, Rab5, ist in diesem Fall mit eGFP fusioniert, der Marker für die späten Endosomen, Rab7, mit YFP. Ein Vergleich der wildtypischen und der Δ Ubi 1-5 Varianten könnte Aufschluß darüber geben, in welchem Stadium der Transport der Δ Ubi 1-5 K18 Mutante an die Zelloberfläche gestört ist.

In beiden Ansätzen wurden HT1080 Zellen mit Fugene transfiziert (Kap. 2.4.3.3) und nach 24h fixiert. Darauf folgte eine DAPI-Färbung und die Proben wurden in Moviöl eingebettet (Kap. 2.7.3). Die Analyse und Auswertung erfolgte am LSM 510 konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss) und mit der „open-source“-Software ImageJ.

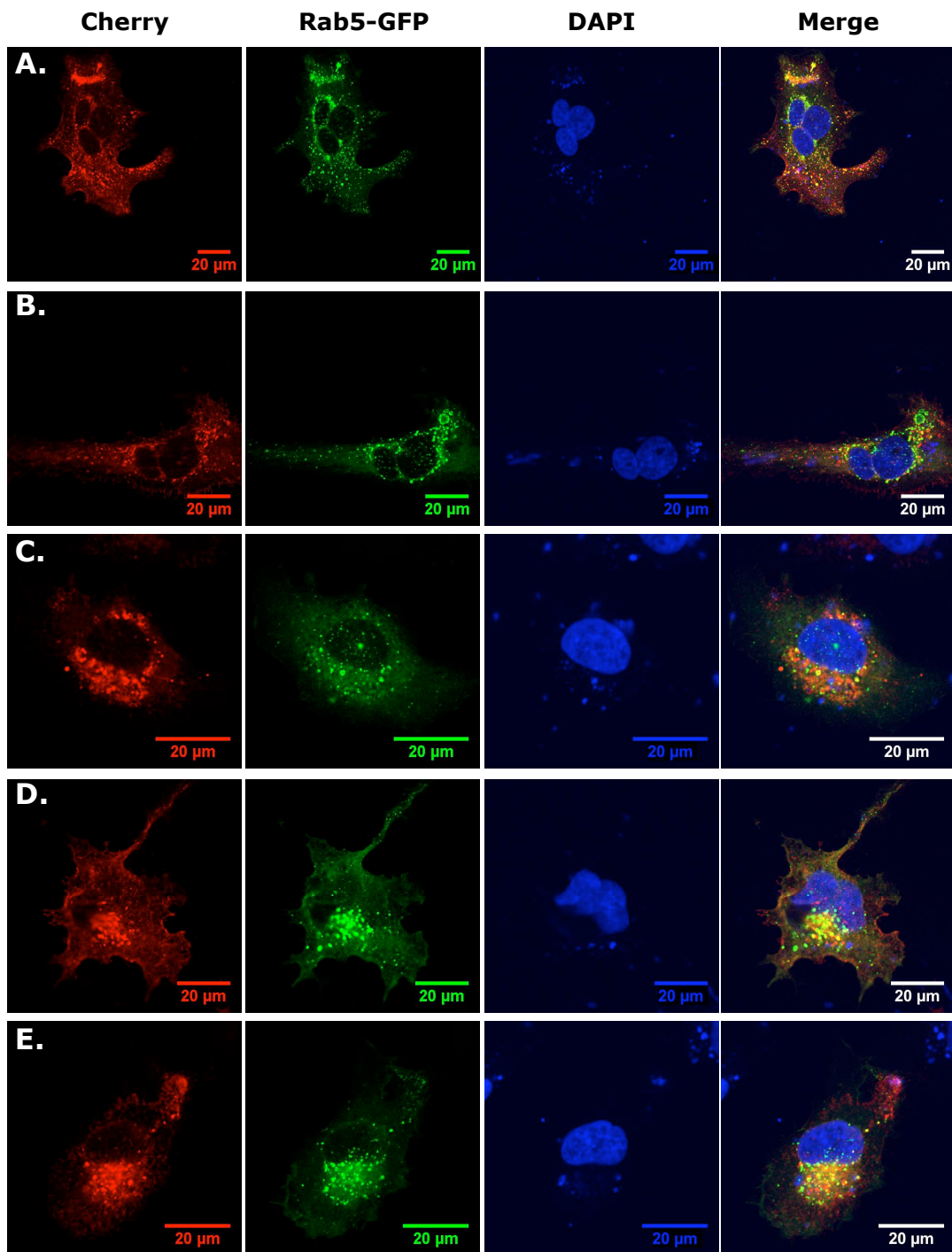


Abbildung 42: Kolokalisationsanalyse Env/Rab5

HT1080 Zellen wurden mit Fugene transfiziert. Fixierung und Färbung erfolgte 24h p.T. Pro Transfektion wurden 1µg der entsprechenden Env Plasmid-DNA, 100ng pRab5-GFP und 0,9µg pcDNA3.1zeo kotransfiziert. **(A)**: Cherry-wt (pczHFVenvEM238), **(B)**: Cherry-ΔUbi 1-5 (pczHFVenvEM236), **(C)**: Cherry-SU/TM (pczHFVenvEM240), **(D)**: Cherry-K18 (pczHFVenvEM242), **(E)**: Cherry-K18+SU/TM (pczHFVenvEM243). Merge: Überlagerung aller Farbkanäle.

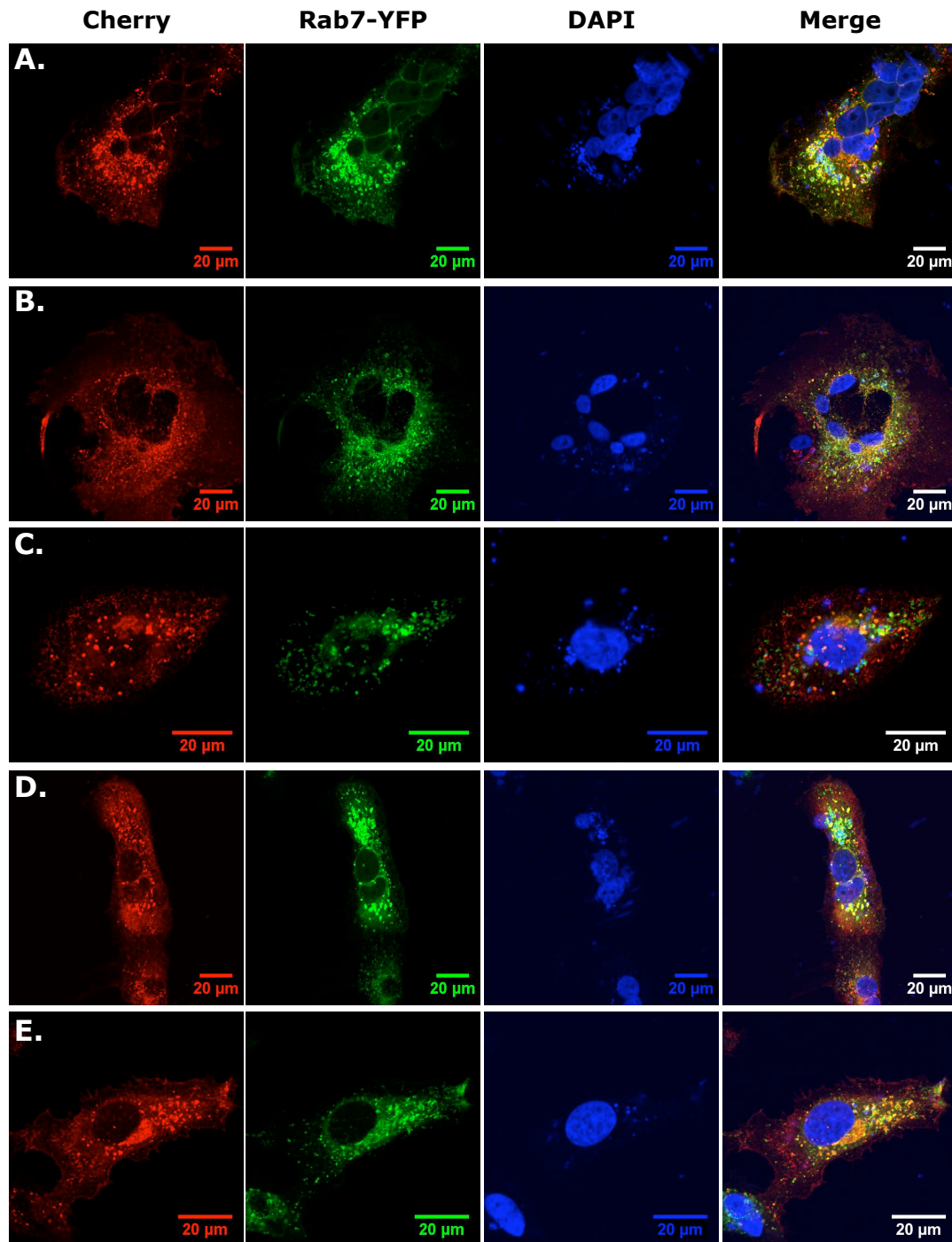


Abbildung 43: Kolokalisationsanalyse Env/Rab7

HT1080 Zellen wurden mit Fugene transfiziert. Fixierung und Färbung erfolgte 24h p.T. Pro Transfektion wurden 1μg der entsprechenden Env Plasmid-DNA, 100ng pRab7-YFP und 0,9μg pcDNA3.1zeo kotransfiziert. **(A)**: Cherry-wt (pczHFVenvEM238), **(B)**: Cherry-ΔUbi 1-5 (pczHFVenvEM236), **(C)**: Cherry-SU/TM (pczHFVenvEM240), **(D)**: Cherry-K18 (pczHFVenvEM242), **(E)**: Cherry-K18+SU/TM (pczHFVenvEM243). Merge: Überlagerung aller Farbkanäle.

Bei der Analyse der Cherry-wt Mutante ließ sich eine deutliche Überlagerung der Signale, Cherry und Rab5-GFP, und somit eine Kolokalisation, vor allem in der Peripherie der Zelle nachweisen (Abb.42A). Die auf der ΔUbi 1-5 Mutante basierende Cherry-markierte Variante (Abb.42B) zeigte eine vergleichsweise geringe Kolokalisation ebenfalls in der Peripherie der Zelle. Die Spaltstellenmutante (Cherry-SU/TM) hingegen, glich mit einer verhältnismäßig

starken Kolokalisation der Cherry-wt Variante (Abb.42C). Diese Kolokalisation war aber in erster Linie um den Zellkern herum zu beobachten. Eine nur mäßige Überlagerung der Signale ließ sich für die Cherry-K18 Mutante zeigen (Abb.42D). Diese fand in Kern nähe statt und lag in ihrer Ausprägung zwischen der Cherry-wt und der Cherry-ΔUbi 1-5 Mutante. Die Kombinationsmutante Cherry-K18+SU/TM zeigte eine relativ starke Kolokalisation (Abb.42E) wiederum in der Nähe des Zellkerns.

Für die auf dem Wildtyp basierenden Varianten ließ sich im Vergleich mit der Cherry-ΔUbi 1-5 Mutante eine relativ starke Kolokalisation der Signale nachweisen. Diese fand in erster Linie in der Peripherie der Zellen statt. Bei den Spaltstellenmutanten jedoch schienen sich die Signale eher in der Nähe des Zellkerns zu überlagern. Obgleich die Cherry-K18 Mutante von der ΔUbi 1-5 Mutante abgeleitet ist, zeigt sie eine gewisse Kolokalisation, und diese vor allem in der Nähe des Zellkerns. Dies könnte eventuell auf die fehlende Prozessierung des Proteins zurückzuführen sein.

Auch die Koexpression des Markers für späte Endosomen (Rab7-YFP) mit den Cherry-markierten PFV Hüllproteinvarianten ergab eine Kolokalisation aller untersuchten Mutanten. Bei der Cherry-wt Mutante ließ sich eine starke Überlagerung der Signale vor allem in der Nähe des Zellkerns zeigen (Abb.43A). Eine nachweisbare, aber deutlich schwächere Kolokalisation mit späten Endosomen konnte für die Cherry-ΔUbi 1-5 Variante ebenfalls in einer region um den Zellkern gezeigt werden (Abb.43B). Eine stärkere Kolokalisation war bei der Cherry-SU/TM zu erkennen (Abb.43C), diese lag jedoch in ihrer Ausprägung unter der für die Cherry-wt Variante. Eine sehr starke Überlagerung der Signale bis in die Peripherie der Zelle konnte für die Cherry-K18 Mutante nachgewiesen werden (Abb.43D), genauso wie für die Kombinationsmutante Cherry-K18+SU/TM (Abb.43E).

Insgesamt zeigte die Cherry-ΔUbi 1-5 Mutante die geringste Kolokalisation mit endosomalen Kompartimenten. Die K18 Mutante hingegen scheint stark in endosomalen Systemen zu lokalisieren. Zusammen mit dem Befund dass diese Mutante nicht an die Zelloberfläche transportiert wird, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass der Transportdefekt im endosomalen Sortiermechanismus liegt. Dies erscheint noch wahrscheinlicher im Hinblick auf die ΔUbi 1-5 Mutante, die in der Plasmamembran gut nachweisbar ist.

3.3.6 Kolokalisationsuntersuchungen mit PFV Gag

Nach der Synthese und dem Zusammenbau von Gag zu foamyviralen Kapsiden sind diese in einem Bereich in der Zelle lokalisiert worden, den man das Mikrotubuli Organisationszentrum (MTOC) nennt (Yu et al., 2006). Dieses MTOC befindet sich in der Nähe des Zellkerns. Aktuelle Studien haben ergeben, dass auch das PFV Env in dieser Region nachweisbar ist (Lindemann, persönliche Mitteilung). Eine spezifische Interaktion zwischen den Proteinen Gag und Env ist absolut notwendig für den Knospungsprozess, und somit sollte durch die fluorchrom gekoppelten PFV Strukturproteine ein Kolokalisationsnachweis möglich sein.

Die Mutante ΔUbi 1-5 K18, die auf Basis der ΔUbi 1-5 Mutante das dritte Lysin in ihrem Leaderpeptid wiedereingeführt trägt, zeigt keinerlei Freisetzung foamyviraler, oder subviraler Partikel. Auch ist der Transport des Proteins an die Oberfläche transfizierter Zellen

unterbrochen. Mit Hilfe der Cherry-markierten Hüllproteinvariante soll nun untersucht werden, ob diese mit dem PFV Gag kolokalisiert, oder ob auch in diesem Bereich ein Defekt vorliegt. Die K18 Mutante wurde als Kombinationsmutante mit inaktivierter SU/TM-Spaltstelle eingesetzt, um jede mögliche Fusion von Membranen zu verhindern. Darüberhinaus wurde eine PFV Hüllproteinmutante eingesetzt, die einen Aminosäureaustausch in ihrer LP-Domäne aufweist. Bei dieser Mutante sind die Tryptophane an den Positionen 13 und 15 durch Alanine ersetzt worden, was die Interaktion zwischen Gag und Env unterbindet. Diese Mutante setzt keine Partikel mehr frei und soll in diesem Versuchsansatz als Negativkontrolle dienen.

Diese Kolokalisationsuntersuchungen wurden auf verschiedene Weisen durchgeführt. In einem Ansatz wurden die Cherry-markierten Env Proteine nur mit Gag-GFP kotransfiziert. In einem weiteren Ansatz wurden die Hüllproteine mit einem Gemisch von Gag-GFP und wildtypischen Gag (1:7) zusammen transfiziert und in einem letzten Ansatz wurde statt dem wildtypischen Gag ein foamyviraler Vektor verwendet. Die Befunde aller drei Ansätze waren vergleichbar. Aus diesem Grund sind exemplarisch die Ergebnisse des letzten Ansatzes, der Transfektion mit dem foamyviralen Vektor, dargestellt.

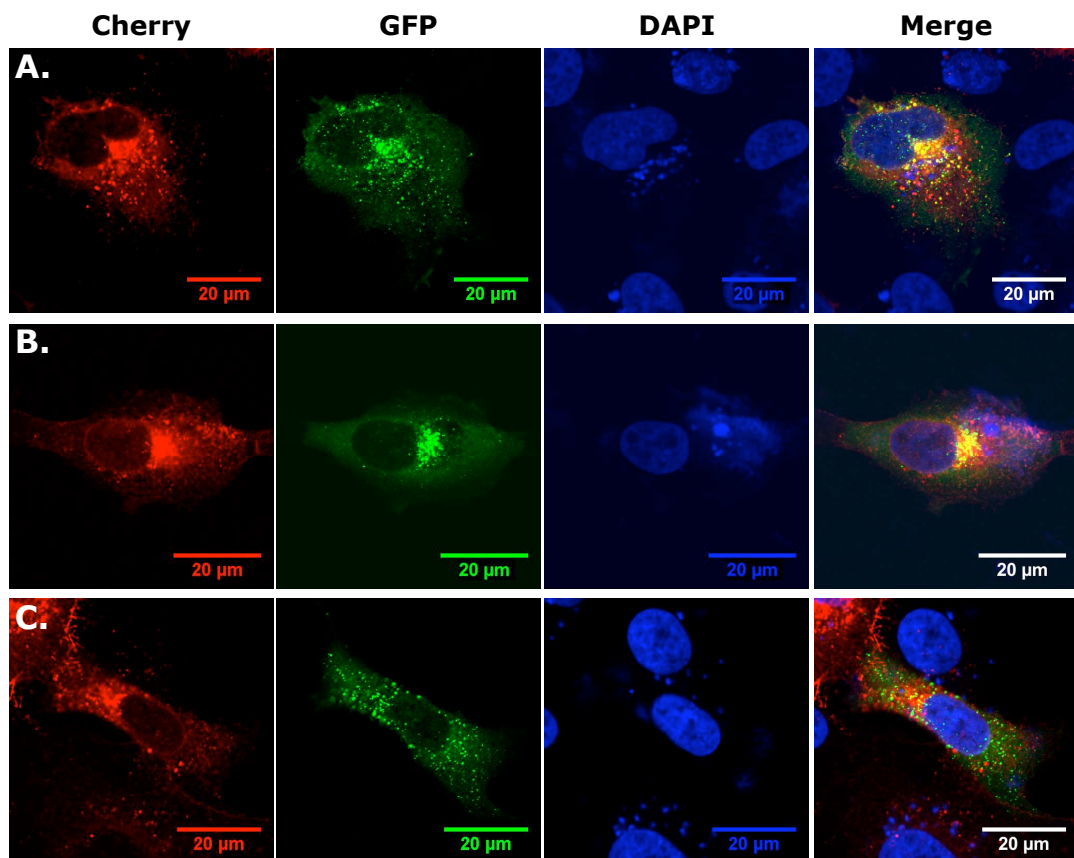


Abbildung 44: Kolokalisationsuntersuchung PFV Env/Gag

HT1080 Zellen wurden mit Fugene transfiziert. Fixierung und Färbung erfolgte 24h p.T. Pro Transfektion wurden 1µg der entsprechenden Env Plasmid-DNA, 50ng pGag 1-648CGFPHH, 0,5µg pczDWP001 und 0,5µg pcDNA3.1zeo kotransfiziert. **(A)**: Cherry-SU/TM (pczHFVenEM240), **(B)**: Cherry-K18+SU/TM (pczHFVenEM243), **(C)**: Cherry-W_{13,15}+SU/TM (pczHFVenEM240). Merge: Überlagerung aller Farbkanäle.

Zur Fugene Transfektion (Kap. 2.4.3.3) wurden 2µg Gesamt-DNA eingesetzt. Die HT1080 Zellen wurden 24h nach Transfektion fixiert und DAPI-gefärbt (Kap. 2.7.3).

Wie bereits bei den Untersuchungen mit einem Marker für den Golgi-Apparat gezeigt, befindet sich das meiste nachweisbare PFV Env in einem Kern-nahen Bereich, der mit der färbung des Golgi-Apparates übereinstimmt (Abb.44A-C). Bei den Mutanten Cherry-SU/TM und Cherry-K18+SU/TM ist in diesem Bereich auch eine starke Gag-Färbung zu beobachten (Abb.44A,B). Vor allem bei der Cherry-markierten Spaltstellenmutante sind in der Peripherie der Zelle auch kolokalisierte Aggregate nachzuweisen, bei denen es sich um Viruspartikel handeln könnte (Abb.44A). Diese über den Zellkörper verteilten punktförmigen Aggregate sind hingegen bei der K18 Mutante nur schwach nachzuweisen. Bei dieser Mutante liegt sowohl das Env als auch das Gag in einer diffusen Verteilung in der Zelle vor (Abb.44.B). Dieser um den Zellkern herum konzentrierten Signalüberlagerung scheint aber nur teilweise eine funktionelle Kolokalisation zu Grunde zu liegen, da für die Tryptophanmutante (W_{13,15}) nachgewiesen wurde, dass sie nicht mehr mit Gag zu interagieren in der Lage ist. Neuere Studien mit sensitiveren Nachweismethoden hingegen deuten daraufhin, dass die Tryptophanmutanten in sehr geringem Maße doch noch in der Lage sind mit Gag zu interagieren, jedoch ungefähr 10000fach in ihrer Infektiosität verringert sind (Stirnnagel, persönliche Mitteilung). Dennoch findet man bei der Cherry-markierten Variante eine relativ starke Gelbfärbung in der Kern-nahen Region transfizierter Zellen (Abb.44C). Dies könnte auf eine Kolokalisation der Proteine im gleichen Kompartiment ohne funktionelle Interaktion schließen lassen.

Die Gag/Env Kolokalisationsstudien lassen zwischen den einzelnen Mutanten keinen eindeutigen Unterschied feststellen. Bei allen drei transfizierten Hüllproteinvarianten lässt sich eine Konzentration sowohl von Gag als auch von Env in einer Region um den Zellkern nachweisen, was auf eine Kolokalisation im oder am Golgi-Apparat hindeutet. Diese Kolokalisation ist bei der Tryptophan-Mutante am schwächsten und bei der Spaltstellenmutanten am stärksten zu beobachten (Abb.44A, C). Auch findet man bei beiden Mutanten kolokalisierte Aggregate, die auf Viruspartikel zurück zu führen sein könnten. Diese partikulären Strukturen lassen sich bei der K18 Mutante nur selten nachweisen. Diese Befunde unterstützen die bisherigen Ergebnisse der konfokalen Mikroskopie, dass die K18 Mutante im Golgi-Apparat oder in endosomalen Strukturen stecken bleibt und keine Viruspartikel freisetzt. Dennoch sind die Ergebnisse nicht ganz klar zu deuten, denn die Tryptophan-Mutante sollte keinerlei Interaktion mehr mit Gag aufweisen, und das ist in diesem System so nicht nachweisbar gewesen. Aufgrund dessen, lässt sich hier nur schwerlich eine tatsächliche Aussage über eine Gag/Env-Kolokalisation treffen.

4 Diskussion

Das foamyvirale Hüllprotein wird als Typ III Protein von Ribosomen am rauen endoplasmatischen Reticulum synthetisiert und anschließend während des Transportes an die Zelloberfläche durch Furin oder eine Furin-ähnliche Protease in seine partikelassoziierten Untereinheiten gp18^{LP}, gp80^{SU} und gp48TM gespalten (Duda et al., 2004). Die LP Untereinheit besitzt nach der Prozessierung eine Typ II-Topologie mit ihrem N-Terminus im Zytoplasma und die TM Untereinheit eine Typ I-Topologie, bei welcher sich der N-Terminus im Lumen befindet (Duda et al., 2004). Die proteolytische Spaltung des Vorläuferproteins erfolgt wahrscheinlich simultan, da in Lysaten transfizierter Zellen keine Prozessierungsintermediate nachweisbar sind (Lindemann et al., 2001). Ungewöhnlich für Retroviren, kann man bei Foamyviren das Signalpeptid in reifen Viruspartikeln nachweisen (Lindemann et al., 2001). Es ist in vielerlei Hinsicht essentiell für die Biologie des Hüllproteins im Hinblick auf dessen Retention im ER sowie die Morphogenese von Viruspartikeln, dass es in der Literatur als Leaderpeptid bezeichnet wird (Übersicht in Lindemann und Goepfert, 2003).

Analysen der Aminosäuresequenz haben 15 potentielle N-Glykosylierungsstellen innerhalb des Proteins vorhergesagt. Davon zwei in der LP Untereinheit, zehn in der SU und drei in der TM Untereinheit. In einer initialen Studie wurden Hüllproteinmutanten hergestellt, bei welchen die Motive für eine N-Glykosylierung jeweils einzeln durch einen Aminosäureaustausch von Asparagin (N) nach Glutamin (Q) inaktiviert wurden. Durch ein verändertes Laufverhalten der gp130^{Env} Vorläuferbanden in Western Blot Analysen konnten jene potentiellen NGS identifiziert werden, die während der Reifung des Proteins durch eine Glykosylierung modifiziert werden. So liefen die Banden von 14 der 15 hergestellten Mutanten schneller als die Vorläuferbande des wildtypischen Hüllproteins, nur die $\Delta N1$ Mutante lief auf gleichem Niveau. Durch die Tatsache dass eine Inaktivierung des N-Glykosylierungsmotivs keinen Einfluß auf das Laufverhalten der $\Delta N1$ Mutante hatte, konnte geschlossen werden, dass an dieser Stelle keine Modifikation des Proteins durch eine Glykosylierung erfolgt, was wiederum die vorgeschlagene Membrantopologie des Leaderpeptids, mit dessen N-Terminus im Zytoplasma, bestätigt. Weitere biochemische Analysen der Hüllproteinmutanten ergaben eine nur sehr schwache virale Partikelfreisetzung für die Mutanten $\Delta N13$ und $\Delta N15$. Dieser Phänotyp war noch stärker ausgeprägt bei der $\Delta N8$ Mutante, bei welcher in unseren Analysen keine Partikelfreisetzung mehr nachgewiesen werden konnte, wohingegen die Inaktivierung der anderen NGS keinen wesentlichen Einfluß auf die Sekretion von Viruspartikeln hatte. FACS-Infektionsanalysen ergaben eine mehr als 1000fach reduzierte Infektiosität für die $\Delta N8$ Mutante, sowie stark reduzierte Infektionseffizienzen für die Mutanten $\Delta N13$ und $\Delta N15$.

Die in dieser Arbeit durchgeführten LacZ-Infektionsanalysen bestätigten diese Phänotypen. Diese Methode wurde aufgrund eines größeren dynamischen Bereichs ausgewählt. Auch bei dieser Analyse konnte keine über dem Hintergrund liegende Infektiosität bei der $\Delta N8$ Mutante gemessen werden. Die Mutanten $\Delta N13$ und $\Delta N15$ lagen klar über der mock-Kontrolle, waren aber im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor 700, bzw. 950 in ihrer Infektionseffizienz erniedrigt. Die $\Delta N11$ Mutante, die stets als eine dem Wildtyp vergleichbare Mutante mitgeführt wurde, zeigte eine 2,5fach erniedrigte Infektiosität.

Vergleichende Analysen foamyviraler Hüllproteine verschiedener Spezies ergaben 5 evolutionär konservierte NGS, wobei hiervon zwei in der SU Untereinheit liegen (N3, N8) und

drei in der TM Untereinheit (N13, N14, N15). Interessanterweise handelt es sich bei den phänotypischen Mutanten um solche mit Aminosäureaustauschen in konservierten NGS. Während sich zwar die Mutanten mit den inaktivierten NGS 3 und 14 phänotypisch weitestgehend unauffällig verhalten, zeigen Mutationen der N8, N13 und N15 drastische Auswirkungen auf die Prozessierung, Partikelfreisetzung und Infektiosität. Das gilt im Besonderen für die Mutante $\Delta N8$, die keine nachweisbaren Viruspartikel mehr freisetzt und folglich nicht mehr infektiös ist. Foamyvirus Hüllproteine liegen als trimere Komplexe auf der Zelloberfläche vor, was für die Stabilität des Komplexes sowie die Rezeptorbindung wichtig ist (Wilk et al., 1999). Die Determinanten für die Bildung solcher trimerer Hüllproteinkomplexe liegen in den extrazellulären Domänen der TM Untereinheiten (Hunter, 1997; Swanstrom und Wills, 1997). Die globuläre Struktur der jeweiligen Domänen spielt darüber hinaus während der Bildung dieser Heterotrimere auch noch eine Rolle bei der „Erkennung“ des Interaktionspartners (Doms et al., 1993). Die Ausbildung der dreidimensionalen Proteinstrukturen erfolgt meist posttranslational im ER und wird wesentlich durch die Anwesenheit von N-gelinkten Oligosacchariden beeinflusst (Nilsson und Heijne, 1993; Hurtley und Helenius, 1989; Chen et al., 1995; Chen und Helenius, 2000). Der Verlust der N-Glykosylierungen an den konservierten Positionen N13 und N15 könnte somit eine Fehlfaltung hervorrufen, die ihrerseits die Ausbildung der trimeren Hüllproteinkomplexe auf der Zelloberfläche verhindert. Möglicherweise wird durch einen Verlust der Fähigkeit diese Trimere zu bilden die Interaktion zwischen Env und Gag während der Morphogenese gestört. Vielleicht wirkt die so genannte „Budding Domäne“ im LP nur im Kontext eines Trimers und reicht als Monomer nicht aus um eine produktive Umhüllung von foamyviralen Kapsiden zu gewährleisten. Denkbar wäre auch, dass sich der trimere Komplex zusammenfindet, aber aufgrund einer Fehlfaltung innerhalb der TM Untereinheit dieser Komplex eine stark veränderte dreidimensionale Konformation aufweist. Diese veränderte räumliche Struktur könnte einen Einfluß auf die Exposition der für eine Interaktion mit Gag wichtigen Tryptophane ($W_{10,13}$) (Lindemann et al., 2001; Wilk et al., 2001) innerhalb der „Budding Domäne“ haben. Dies könnte wiederum zu einem Verlust oder einer starken Verminderung der Interaktion mit den gebildeten Kapsiden führen. Denkbar wäre aber auch, dass aufgrund der Fehlfaltungen die räumliche Lokalisation der phänotypischen Mutanten verändert ist, und somit eine Interaktion zwischen Gag und Env nicht möglich scheint. Der gezeigte Effekt liegt zumindest auf Seiten des Hüllproteins begründet, da in elektronenmikroskopischen Aufnahmen dieser Mutanten, bei einer Koexpression eines foamyviralen Vektors, eine Akkumulation von Kapsiden im Zytoplasma zu beobachten war (Daten nicht gezeigt). Außerdem konnte in den Lysaten transfizierter Zellen stets eine vergleichbare Menge an Gag Proteinen nachgewiesen werden, unabhängig davon, ob es sich bei dem kotransfizierten Hüllprotein um das wildtypische Glykoprotein oder um eine NGS Mutante gehandelt hat.

Der Verlust der Partikelfreisetzung der $\Delta N8$ Mutante hingegen ist wahrscheinlich in erster Linie auf einen massiven Prozessierungsdefekt zurück zu führen. Während man für alle Mutanten, sowie den Wildtyp, stets eine vergleichbare Expression des gp130^{Env} Vorläufers nachweisen konnte, scheint die proteolytische Prozessierung in die Untereinheiten LP, SU und TM nicht mehr, oder nur noch in sehr geringem Maße statt zu finden, da keine LP-Spaltprodukte in Western Blot Analysen nachweisbar sind. Ähnliches gilt auch für die

Mutanten $\Delta N13$ und $\Delta N15$, wenn auch nicht so ausgeprägt. Das bedeutet, dass jene Mutanten, die keine, oder eine stark herabgesetzte Partikelfreisetzung zeigen, auch keine oder eine nur sehr schwache Hüllproteinprozessierung aufweisen. Dies könnte möglicherweise an einem Transportdefekt des Proteins aus dem ER an die Zelloberfläche liegen, da das foamyvirale Hüllprotein von Furin oder einer Furin-ähnlichen Protease prozessiert wird, und dies nicht im ER, sondern im Golgi-Apparat, bzw im Trans-Golgi Netzwerk (TGN) stattfindet (Thomas, 2002). Um dieser Frage nachzugehen, wurde die Expression der Hüllproteine auf der Plasmamembran transfizierter Zellen durch eine Oberflächenbiotinylierung analysiert. Für den Wildtyp, sowie für die $\Delta N11$ Mutante konnte eine klare Expression des Vorläufers, sowie des SU-Spaltproduktes auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Bei den Mutanten $\Delta N13$ und $\Delta N15$ war zwar eine Vorläuferbande zu detektieren, aber nur im Falle der $\Delta N13$ Mutante auch eine SU Bande. In mit $\Delta N8$ Mutanten transfizierten Zellen ließen sich keine foamyvirale Hüllproteine auf der Oberfläche nachweisen, d.h. weder Vorläuferproteine noch das SU-Spaltprodukt. Durch die Bestimmung der zellulären Gesamtproteinexpression jedoch konnte gezeigt werden, dass sowohl die N-Glykosylierungsmutanten, als auch das wildtypische Env auf annähernd gleichem Niveau exprimiert wurden. Dies weist auf einen Prozessierungsdefekt und auf einen Transportdefekt hin.

Ähnliches ist auch für andere Retroviren wie beispielsweise Friend-MuLV (Fr-MuLV) beschrieben worden (Kayman et al., 1991). Hier führte eine Inaktivierung der 4.NGS, von insgesamt acht potentiellen N-Glykosylierungsstellen, zu einem Verlust der Prozessierung in SU und TM, sowie zu einer Retention des mutierten Proteins im ER. Dies wurde durch eine möglicherweise gestörte Interaktion mit den an der Faltung des Proteins beteiligten Chaperonen erklärt. MuLV Env trägt, abhängig von der jeweiligen Spezies, zwischen sieben und acht potentielle NGS, wobei hier, ähnlich wie bei Foamyviren, jene NGS deren Mutation zu einem starken Phänotyp führt bei Fr-MuLV, MuLV und FeLV hoch konserviert ist. Vergleichbar mit unseren Befunden, hatte eine Mutation von sechs der restlichen sieben NGS im Fr-MuLV keinen negativen Einfluß auf die Virusreplikation, wohingegen eine Inaktivierung der 5.NGS zu einem Phänotyp ähnlich der $\Delta N13$ führte, mit herabgesetzter aber nicht komplett inhibierter Virusreplikation (Kayman et al., 1991). Bei Moloney-MuLV (Mo-MuLV) trägt die Env SU Untereinheit 7 potentielle NGS, die auch alle glykosyliert werden (Rosner et al., 1980). Die TM Untereinheit hingegen beherbergt nur eine, welche aber nicht für eine Modifikation durch Oligosaccharide genutzt wird (Bause, 1983). Auch bei Mo-MuLV konnte eine Notwendigkeit von N-Glykosylierungen für einen korrekten Transport aus dem ER nachgewiesen werden (Rein et al., 1982), und eine Inaktivierung der 3.NGS führte ähnlich wie bei der PFV $\Delta N8$ Mutante zu einem totalen Verlust der Partikelfreisetzung und der Infektiosität (Felkner und Roth, 1992). Ein ähnlicher, aber kumulativer Effekt ergab sich bei Untersuchungen mit dem Hüllprotein von HIV-1. So führten einzelne Inaktivierungen der sechs NGS in den V1 und V2 Loops zu keinem Effekt. Kombinationsmutanten mit bis zu drei inaktivierten NGS hatten ebenfalls keinen Effekt auf die Fusionsaktivität des HIV Env. Die Inaktivierung von vier bis fünf jedoch ergaben eine reduzierte Zellfusion in mit diesen Hüllproteinvarianten transfizierten Zellen. Wurden jedoch alle sechs NGS gleichzeitig durch einen Aminosäureaustausch inaktiviert, ergab dies einen Phänotyp, der jegliche Fähigkeit zur Induktion von Membranfusionen verloren hat (Quiñones-Kochs et al., 2002). Zu analogen

Ergebnissen bei SIV kamen Reitter und Desroisiers (Reitter und Desroisiers, 1998), sowie Ohgimoto und Kollegen (Ohgimoto et al., 1998). Der Verlust von N-Glykosylierungen in der gp41 Untereinheit von HIV-1 hingegen resultiert in einer ER Retention und führt zu einem Verlust jeglicher Prozessierung dieses Proteins, da diese im Golgi-Apparat stattfindet (Fenouillet und Jones, 1995). Der Einfluß von N-Glykosylierungen auf die Reifung und den Transport von Hüllproteinen, sowie die Replikation, konnte aber auch für eine ganze Reihe von Viren anderer Familien nachgewiesen werden (HBV: Patzer et al., 1984; Block et al., 1994; Werr und Prange, 1997; Ebola: Oliver et al., 1999; Jeffers et al., 2002; VSV: Mathieu et al., 1996; Dengue: Pryor et al., 1998; Masern: Hu et al., 1995; HCV: Meunier et al., 1999).

Im foamyviralen Hüllprotein scheinen folglich drei der fünf konservierten N-Glykosylierungsstellen essentiell für einen Transport des Proteins, eine produktive Prozessierung, sowie für die Umhüllung und die Freisetzung von viralen Partikeln zu sein. Durch den Aminosäureaustausch von Asparagin zu Glutamin wird das Erkennungsmotiv einer N-Glykosylierung zerstört und eine Modifikation an dieser Position effizient verhindert. Für Fr-MuLV jedoch ist beschrieben worden, dass eine Mutation flankierender Aminosäuren auch einen negativen Einfluß auf die Prozessierung und die Stabilität der Hüllproteine hat (Li et al., 1997). Ob die beobachteten foamyviralen NGS Phänotypen durch den Aminosäureaustausch an sich, oder tatsächlich durch eine fehlende Kohlenhydratkette an diesen Positionen, beziehungsweise veränderte Gesamtglykosylierung, entstanden sind, wurde durch die Herstellung weiterer Mutanten untersucht. Hierfür wurden Mutationen in den konservierten N-Glykosylierungsstellen N8, N13 und N15 eingeführt. Der erste Satz an Mutanten (Δ NX.1) betraf die jeweiligen dritten Aminosäuren innerhalb des Erkennungsmotivs N-X-T/S. Diese Aminosäure ist als essentiell für eine N-Glykosylierung beschrieben worden, obgleich sie selbst nicht modifiziert wird (Kornfeld und Kornfeld, 1985). Im zweiten Satz Mutanten wurden die jeweils mittigen Aminosäuren konservativ durch einen Aminosäureaustausch ersetzt (Δ NX.2). Diese Aminosäure hat, mit Ausnahme von Prolin, keinen Einfluß auf eine N-Glykosylierung (Kornfeld und Kornfeld, 1985).

Die biochemische Analyse der Δ NX.1 Mutanten ergab Δ NX ähnliche Phänotypen. Die Effizienz der Env Prozessierung bei den Mutanten Δ N13.1 und Δ N15.1 war zwar deutlich schwächer als beim Wildtyp, aber dennoch in LP-spezifischen Western Blots deutlich nachweisbar, wobei die Δ N15.1 Mutante eine höhere Signalstärke als die Δ N13.1 Mutante zeigt. Für die Δ N8.1 konnte wie bei der Δ N8 Mutante keine Prozessierung des Hüllproteins nachgewiesen werden. Entsprechend diesen Verhältnissen setzten die Mutanten Δ N13.1 und Δ N15.1 auch virale Partikel frei, jedoch auf einem relativ niedrigen Niveau, wohingegen für die Δ N8.1 wiederum keinerlei Partikelfreisetzung zu beobachten war. Die jeweiligen Δ NX.2 Mutanten ließen sich bei keiner Hüllproteinvariante von dem Phänotyp des Wildtyps zu unterscheiden. Sie alle wiesen eine starke Prozessierung und Partikelfreisetzung auf.

Interessanterweise war für die Mutanten Δ N13.1 und Δ N15.1 eine im Vergleich zu den dazugehörigen Δ N13 und Δ N15 Mutanten höhere Prozessierungsrate und effizientere Partikelfreisetzung zu beobachten, obgleich auch bei diesen Hüllproteinmutanten eine effiziente N-Glykosylierung verhindert wird. Möglicherweise wird trotz dem in der Literatur beschriebenen Totalverlust der Glykosylierung bei einem Austausch der dritten Aminosäure doch ein geringer Teil N-glykosyliert. Wäre dies in so geringem Maße der Fall dass man diese Proteine nicht in Western Blot Analysen nachweisen kann, und würden diese Proteine

in Kombination mit den nicht-glykosylierten Proteinen in die entstehenden Viruspartikel eingebaut, könnte dies den leichten Anstieg in der Partikelfreisetzung der Mutanten $\Delta N13.1$ und $\Delta N15.1$ erklären. Dies ist jedoch bislang, nach meinem Wissen, nicht beschrieben worden.

Infektionsanalysen ergaben eine generell gestiegene Infektiosität im Vergleich zu den ursprünglichen ΔNX Mutanten. Stieg die Infektionseffizienz bei der $\Delta N13.1$ Mutante um den Faktor 4, konnte für die $\Delta N15.1$ Mutante ein ungefähr 30facher Anstieg, auf ca. 4% des Wildtyps, beobachtet werden. Die Mutation der dritten Aminosäure des achten NGS führte ebenso wie die Mutation der ersten Aminosäure zu einer Mutante die keinerlei Infektiosität mehr zeigt. Während bei der $\Delta N8.2$ und der $\Delta N13.2$ die Infektionseffizienzen bei 70, bzw. 80% des Wildtyps lagen, war diese bei der $\Delta N15.2$ interessanterweise auf 40% reduziert. Dieser Befund ist insofern interessant, da die Partikelfreisetzung der $\Delta N15.2$ Mutante nicht beeinträchtigt zu sein scheint. Diese Mutante scheint in relativ hohem Maße defekte Viruspartikel zu sekretieren. Möglicherweise ist dies auf eine verringerte Stabilität der Env Komplexe auf der Oberfläche der Virionen durch die fehlende N-Glykosylierung in der TM Untereinheit, und somit auf eine erniedrigte Affinität der Hüllproteine für ihren entsprechenden Rezeptor auf der Zelloberfläche zurückzuführen (Doms et al., 1993). Ähnlich wie bei Fr-MuLV (Li et al., 1997) scheint die Ausbildung eines Phänotyps durch die Mutation der 15. NGS also nicht alleine abhängig von der Glykosylierung an sich zu sein, sondern auch von der Aminosäuresequenz in dieser Region

Infektionsanalysen bei 30°C hingegen ergaben einen deutlich temperatursensitiven Phänotyp. Während die Mutanten der achten N-Glykosylierungsstelle weiterhin keinerlei Infektiosität aufwiesen, konnte ein genereller Anstieg der relativen Infektiosität bei allen anderen Mutanten gezeigt werden. Besonders auffallend jedoch war die Mutante $\Delta N15$. Lag diese bei 37°C nur knapp über dem Detektionslimit, stieg sie bei 30°C um das 50fache auf über 20% des Wildtyps. Für andere virale Hüllproteine ist bereits eine Temperatursensitivität von Hüllproteinen nachgewiesen worden (Übersicht in Doms et al., 1993). Doms und Kollegen beschreiben diese als temperaturabhängig fehlgefaltete Proteine, deren korrekte Faltung bei einer niedrigeren Temperatur wieder gewährleistet sein kann (Doms et al., 1993). Eine Inaktivierung der zweiten NGS im Hüllprotein von Mo-MuLV beispielsweise, führt zu einem Verlust jeglicher Replikation bei 37°C (Felkner und Roth, 1992). Eine Replikation bei 32°C hingegen scheint nicht beeinträchtigt zu sein durch die fehlende N-Glykosylierung an dieser Position. Möglicherweise trifft dies auch zumindest teilweise auf die $\Delta N15$ Hüllproteinvariante zu. Neben Hüllproteinen können auch andere virale Komponenten an der Ausbildung einer temperatursensitiven Mutante beteiligt sein. So ist für das Vaccinia Virus beispielsweise eine temperaturabhängige Variante beschrieben worden, bei welcher das JR1 Protein nur bei 31°C in der Lage dazu ist einen Proteinkomplex zu stabilisieren, der für eine korrekte Partikelmorphogenese essentiell ist (Chiu et al., 2005).

Bei den Mutanten der achten und dreizehnten NGS scheint die Ausbildung der Phänotypen, im Gegensatz zur $\Delta N15$ Mutante, in erster Linie auf die fehlende Glykosylierung zurückzuführen sein. Während bei Mutationen der ersten und dritten Aminosäure des 13. N-Glykosylierungsmotivs eine nur schwache, aber dennoch nachweisbare, Prozessierung, Freisetzung viraler Partikel und Infektiosität zu beobachten ist, werden diese Phänotypen bei einer Mutation der mittleren Aminosäure wieder aufgehoben. Ähnlich, aber mit

ausgeprägteren Phänotypen stellen sich die Mutanten der achten NGS dar. Hier wird die Abhängigkeit von der Glykosylierung noch deutlicher. Während weder eine Prozessierung noch eine Partikelfreisetzung, und folglich auch keine Infektiosität, für jene Mutanten zu beobachten war, die Substitutionen der ersten und dritten Aminosäure trugen, stellte sich erneut ein dem Wildtyp vergleichbarer Phänotyp bei einer Mutation der mittleren Aminosäure ein.

Der Prozessierungsdefekt liegt wahrscheinlich in der Retention der mutierten Proteine im ER begründet. Die Synthese der FV Hüllproteine erfolgt im endoplasmatischen Reticulum, und wie Duda und Kollegen (Duda et al., 2004) nachweisen konnten, wird das PFV Env Vorläuferprotein von Furin oder einer Furin-ähnlichen Protease prozessiert. Diese proteolytische Spaltung von Proteinen jedoch erfolgt erst im Golgi-Apparat oder im TGN (Thomas, 2002). Deglykosylierungsanalysen haben eine partielle EndoH-Resistenz des wildtypischen Hüllproteins belegen können, was auf eine Anwesenheit von komplexen Kohlenhydratketten hinweist (Kornfeld und Kornfeld, 1985; Tarentino et al., 1989). Die Sensitivität von Glykoproteinen gegenüber spezifischen Glykosidasen lässt einen Rückschluss auf die Lokalisation des Proteins zu, oder zumindest darüber, welche zellulären Kompartimente während des Transports an die Zelloberfläche passiert werden. Die partielle EndoH-Resistenz foamyviraler Hüllproteine belegt, dass diese im medialen oder trans-Golgi Bereich eine Prozessierung und Modifikation ihrer Oligosacharidketten erfahren (Kornfeld und Kornfeld, 1985; Tarentino et al., 1989). Die Qualitätskontrolle im ER jedoch, bewirkt, dass fehlgefaltete Glykoproteine im ER verbleiben und somit nicht an den Ort der Virusmorphogenese oder der Knospung gelangen (Doms et al., 1993). Dies kann zum einem durch eine Exposition von endständiger Glukose bedingt sein, zum anderen aber auch durch eine faltungsbedingte Veränderung der Hydrophilität des Proteins (Doms et al., 1993). So sind fehlgefaltete Proteine meist deutlich hydrophober und bilden im ER Aggregate, was zu einer verminderten Effizienz des Transports und zu einer verstärkten Degradierung der Proteine führen kann (Doms et al., 1993). Vergleicht man die Phänotypen der foamyviralen NGS Mutanten mit solchen anderer Retroviren oder Viren anderer Familien lassen sich ähnliche Transportdefekte nachweisen. Diese Befunde machen es wahrscheinlich, dass eine fehlende Glykosylierung an den Positionen N8, N13 und N15 zu Fehlfaltungen des Proteins führen, was wiederum in einer Retention dieser Proteine im ER resultiert. Für das Verbleiben im ER sprechen die Prozessierungsdefekte dieser Mutanten, da sie für eine Prozessierung im Golgi-Apparat lokalisiert sein müssen (Thomas, 2002), sowie die verminderte oder, im Falle der Δ N8 Mutante, nicht nachweisbare Oberflächenexpression. Der Arrest im ER ist aber nicht für alle Mutanten absolut. Obgleich die Δ N8 Mutante keine Partikelfreisetzung mehr zeigt, konnte für die Mutanten Δ N13 und Δ N15 noch eine basale Fähigkeit zur Umhüllung von Kapsiden und zur Freisetzung infektiöser Viruspartikel nachgewiesen werden. Möglicherweise ist bei letzteren Mutanten die Kinetik der Faltung und des Exportes aus dem ER, und somit auch der Umhüllung von Kapsiden und der Freisetzung nur massiv herabgesetzt. Eine stark verlangsamte Faltung, sowie ein verlangsamter Transport des Hüllproteins ist beispielsweise für das VSV G-Protein nachgewiesen worden (Mathieu et al., 1996). Eine durch fehlende N-Glykosylierungen des Hüllproteins stark herabgesetzte Replikationsgeschwindigkeit konnte auch für Dengue Viren gezeigt werden (Pryor et al., 1998). Vielleicht jedoch handelt es sich bei Foamyviren um eine Kombination aus beidem.

Die nur minimale Fähigkeit zur Freisetzung viraler Partikel könnte in einer Fehlfaltung und Retention im ER, sowie einer herabgesetzten Kinetik des Transports an die Oberfläche der Zelle liegen.

Diese Untersuchungen heben die Bedeutung der konservierten NGS im foamyviralen Hüllprotein hervor. Neben dem wahrscheinlichen Faltungsdefekt und der damit einhergehenden ER Retention der Hüllproteine, ausgelöst durch eine Mutation eben dieser Motive, erfüllen diese Bereiche *in vivo* meist noch eine biologische Funktion. So wird beispielsweise der extrazellulären, luminalen Domäne der TM Untereinheit von retroviralen Hüllproteinen eine wichtige Rolle bei der Oligomerisierung der Hüllproteine während der Bildung der trimeren Komplexe zugesprochen. Die Bindung von Foamyviren an den zellulären Rezeptor wiederum, wird maßgeblich von der Anwesenheit der achten NGS bestimmt (Duda et al., 2005). So ermöglichen die *in vitro* gewonnenen Kenntnisse über beobachtete Phänotypen eine gute Aussage über die Eigenschaften des Transports des Hüllproteins oder dessen Faltung. Die nichtphänotypischen Mutanten hingegen bleiben weiterhin einer genaueren Bestimmung verborgen. N-Glykosylierungen sind beispielsweise *in vivo* bei HIV als anti-immunogenes Schild beschrieben worden (Nara et al., 1991; Reitter et al., 1998), welches antigene Epitope vor dem Immunsystem des Wirtes zu verbergen vermag. Darüber hinaus können sich N-gelinkte Glykane veränderlich auf die Resistenz eines Virus gegenüber spezifischen Antikörpern auswirken (Gram et al., 1994; Back et al., 1994), oder einen Wechsel der Korezeptorspezifität bedingen (Pollakis et al., 2001). Es wäre denkbar dass gerade eine Inaktivierung konservierter NGS *in vivo* im foamyviralen Hüllprotein zur Ausbildung neuer Phänotypen führt, die einem bei der Betrachtung *in vitro* entgehen. Auch wäre eine Veränderlichkeit der Struktur des Hüllproteins durch den selektiven Druck durch das Immunsystem möglich. Ähnliches ist für die variablen Regionen (V1-V5) des HIV-1 Env Proteins nachgewiesen worden. So variierte in einer Studie die Anzahl der potentiellen NGS innerhalb des HIV Env Proteins im Laufe einer Infektion von 24 bis 31, oder es kam zu räumlichen Rearrangements der NGS bei gleich bleibender Gesamtzahl (Dacheux et al., 2004). Analysen möglicher Rearrangements oder veränderter Aminosäuresequenzen würde es auch möglich machen, das PFV Env Protein hinsichtlich variabler Bereiche zu kartieren. Die niedrige Replikationsrate von Foamyviren *in vivo* jedoch ist nur einer von mehreren Gründen, die solche Untersuchungen unpraktikabel erscheinen lassen.

Durch die Untersuchungen über das Muster der N-Glykosylierung des foamyviralen Hüllproteins konnte gezeigt werden, dass die extrazellulären, oder luminalen Domänen an allen enthaltenen potentiellen N-Glykosylierungsmotiven auch tatsächlich durch Oligosaccharide modifiziert werden. Alleine die im zytoplasmatischen Teil des Leaderpeptids gelegene N-Glykosylierungsstelle N1 wird nicht genutzt. Dieser Befund lässt sich im Hinblick auf die Mechanismen und die Kompartimente, in welchen eine N-Glykosylierung erfolgt, gut erklären, da sie im Lumen des ER und des Golgi-Apparates stattfinden (Stryer, 1996). Hingegen haben Stanke und Kollegen (Stanke et al., 2005) eine starke Ubiquitinierung des zytoplasmatischen Anteils des LP zeigen können. Diese Ubiquitinierungen scheinen eine maßgebliche Rolle bei der Regulation der Partikelfreisetzung und des Transports des PFV Hüllproteins zu haben. Dies wird besonders deutlich bei einer Mutante, die keine Lysine mehr in ihrem LP trägt, und im krassen Gegensatz zum wildtypischen PFV Env Protein

massiv subvirale Partikel freisetzt. Diese Mutante erscheint auch in ihrer Infektionseffizienz nach transienter Transfektion entsprechender Expressionsplasmide zweieinhalbfach im Vergleich zum Wildtyp erhöht (Stanke et al. 2005).

Ubiquitin ist neben seiner Funktion als Signal für den proteolytischen Abbau von Proteinen durch das 26S Proteasom (Johnson et al., 1992; 1995; Thrower et al., 2000; Weissman, 2001), in monomerer Form auch noch als Signal für eine Internalisierung von der Plasmamembran beschrieben worden (Terrell et al., 1998; Roth und Davis, 2000; Shih et al., 2000; Nakatsu et al., 2000). So konnten Shih und Kollegen (Shih et al., 2000) durch die Fusion eines monomeren Ubiquitins an ein stabil auf der Oberfläche von Zellen exprimiertes Protein, dessen Halbwertszeit in der Plasmamembran um den Faktor 4 verringern, sowie nachweisen, dass ein fusioniertes Monoubiquitin funktionell dazu in der Lage ist ein originales Internalisierungssignal zu ersetzen.

Die im Vergleich zum PFV Wildtyp starke Sekretion subviraler Partikel der Δ Ubi 1-5 Mutante, jener ohne die im LP enthaltenen Lysine, macht es wahrscheinlich, dass Ubiquitin direkt an der intrazellulären Verteilung des Hüllproteins, sowie an dessen Rückhaltung von der Plasmamembran beteiligt ist. Dieser Theorie folgend wurden verschiedene Hüllproteinmutanten hergestellt, die ein Monoubiquitin, im gleichen Leseraster, an die Δ Ubi 1-5 Mutante fusioniert tragen. Durch eine biochemische Analyse sollten diese Hüllproteinvarianten Aufschluß darüber geben, ob ein Monoubiquitin dazu in der Lage ist, einen, dem wildtypischen PFV Hüllprotein ähnlichen, Phänotyp der jeweiligen Mutante erneut herzustellen.

Für die Herstellung der Ubi-Fusionsproteine wurde Ubiquitin ohne dessen zwei endständigen Glyzine an das Env Protein fusioniert, da diese als Erkennungssignal für Ubiquitinhydrolasen dienen, und diese es während der Reifung des Proteins abspalten könnten (Gilchrist et al., 1997; Shih et al., 2000). Einzig die N-Ubi 1 Mutante trägt ein Ubiquitin in voller Länge und es konnte in biochemischen Analysen gezeigt werden, dass eben dieses abgespalten wird. Ähnliches gilt auch für die N-Ubi 3 Mutante, die zwischen dem Ubiquitin in voller Länge und dem folgenden Glyzin/Serin-Linker ein Prolin trägt. Ein Prolin an einer solchen Position ist als inhibierend auf eine Ubiquitinprozessierung beschrieben worden (Gonda et al., 1989). Den Autoren folgend, sollte das Prolin die Prozessierung um den Faktor 20 herabsetzen, wobei es in unseren Studien diese weder verhindern noch deutlich herabsetzen konnte. Zwar konnte man durch Detektionen mit α -Ubiquitin Antikörpern eine leichte Ubiquitinierung des LP erkennen, dieses jedoch nicht mit einem LP-spezifischen Antikörper nachweisen. Möglicherweise ist die Spaltung zwischen dem LP und dem Ubiquitin nicht vollständig, aber dennoch so effizient, dass das LP in Western Blot Analysen spezifisch nicht mehr nachweisbar ist. Daher hinterließen die jeweilige Abspaltung des Ubiquitins vom N-Terminus der beiden Fusionsproteine erneut foamyvirale Leaderpeptide, die zwar noch mit einem Glyzin/Serin-Linker versehen, sich aber sonst nicht von dem LP der Δ Ubi 1-5 Mutante unterscheiden, weshalb sie für weitere Studien nicht mehr verwendet wurden.

Biochemische Analysen aller weiteren Ubi-Fusionsproteine ließen eine generell erniedrigte Freisetzungsrate für subvirale Partikel erkennen, sowohl für die N- als auch für die C-terminalen Fusionen. Die manchmal heterogene Expression der Vorläuferproteine wurde bei den Quantifizierungen der Western Blot Signale berücksichtigt, da die SVP stets in

ihrer Expression auf die Lysate normalisiert wurden. Da bei der Mutante N-Ubi 2 in ersten Analysen das Ubiquitin nicht abgespalten wurde, und sie stets den deutlichsten Phänotyp gezeigt hat, also am wenigsten SVP freigesetzt hat, diente sie als Ausgangsbasis für weitere Klonierungen. Bei diesen neuen Mutanten trägt das fusionierte Ubiquitin interne Mutationen. Zum einen sind jeweils die für die Internalisierung als wichtig beschriebenen Aminosäuren Phenylalanin (F4A) und Isoleuzin (I44A) durch Alanin, zum anderen die Lysine an den Positionen 48 (K48R) und 63 (K63R) durch Arginin einzeln ersetzt worden.

Quantifizierungen ergaben eine um mehr als die Hälfte verringerte SVP Freisetzung für die N-Ubi 2 F4A Mutante verglichen mit der Δ Ubi 1-5 Hüllproteinvariante. Sie zeigte eine noch stärkere Reduktion der SVP Freisetzung als die N-Ubi 2 Mutante, was einen interessanten Phänotyp darstellt. Diese Aminosäure ist als essentiell für die Funktion des Ubiquitins als Internalisierungssignal beschrieben worden (Shih et al., 2000) und ein Austausch dieser Aminosäure hatte in anderen Studien stets einen schwerwiegenden Effekt auf die Internalisierung (Sloper-Mould et al., 2001). Im Kontext einer Fusion mit dem foamyviralen Env Protein hingegen, scheint diese Aminosäure nicht notwendig für die Initiation einer Endozytose zu sein. Anders verhält es sich jedoch mit der N-Ubi 2 I44A Mutante. Diese ist in ihrer Effizienz der Freisetzung subviraler Partikel nicht wesentlich von der Δ Ubi 1-5 Mutante zu unterscheiden. Diesen Phänotyp würde man auch erwarten, da das Isoleuzin an der Position 44 ebenso wie das Phenylalanin an Position 4 als Teil des Endozytosesignals beschrieben wird (Shih et al., 2000; Sloper-Mould et al., 2001). Beide Aminosäuren sind Teil eines hydrophoben Bereichs auf der globulären Oberfläche des Ubiquitinmoleküls (Sloper-Mould et al., 2001) welcher sowohl für eine Internalisierung (Shih et al. 2001), als auch für die Erkennung durch das Proteasom (Beal et al., 1996) wichtig ist. Möglicherweise jedoch ist die Konformation des Proteins oder dessen Hydrophobizität so entscheidend, dass selbst konservative Aminosäureaustausche einen schwerwiegenden Effekt auf die Funktionalität dieses Bereiches haben. Dass ein AS-Austausch durch eine konservative Aminosäure sich auf einen Bereich stärker auswirkt als auf einen anderen, ließe sich durch die Komplexität der dreidimensionalen Strukturen globulärer Proteine erklären. Diese werden nicht ausschließlich von Schwefelbrücken vorgegeben, sondern auch die Ladung, die Größe und die Hydrophobizität der einzelnen Aminosäuren spielen eine Rolle. So ist es durchaus denkbar, dass der Austausch einer AS an einer Position sich nachhaltig auf die Konformation und die Funktion des Proteins auswirkt, wohingegen an einer anderen Position eine ähnliche Veränderung der AS-Sequenz keinen oder einen nur marginalen Effekt zeigt.

Eine der I44A Mutante vergleichbare SVP Freisetzung konnte auch für die internen Lysin-Mutanten K48R und K63R beobachtet werden. So lagen sie deutlich über der ursprünglichen N-Ubi 2 Mutante, auf einem Δ Ubi 1-5 vergleichbarem Niveau. Obgleich ein Monoubiquitin als Internalisierungssignal beschrieben worden ist (Terrell et al., 1998; Roth und Davis, 2000; Shih et al., 2000; Nakatsu et al., 2000), scheint es nicht stark genug zu sein, eine Endozytose effizient zu induzieren. Dies gilt in noch verstärktem Maße für die K48R und K63R Mutanten, die noch weiter in dieser Funktion reduziert sind. Die Lysine an den Positionen K48 und K63 sind auch als jene beschrieben worden, die maßgeblich an der Bildung von Polyubiquitinketten beteiligt sind (Pickart, 2001; Weissman, 2001). Galan und Haguenauer-Tsapis (Galan und Haguenauer-Tsapis, 1997), sowie Springael und Kollegen

(Springael et al., 1999) haben darüber hinaus beschrieben, dass eine Diubiquitinierung über das im Ubiquitin enthaltene Lysin an Position 63 in manchen Fällen eine Internalisierung der so markierten Proteine noch verstärken kann. Möglicherweise gilt dies im gleichen Maße auch für das Lysin an Position 48, welches in seiner phänotypischen Ausprägung nicht von der K63R Mutante zu unterscheiden ist. Die beobachteten höheren Banden lassen zwar auf eine mehrfache Ubiquitinierung schließen, wahrscheinlich findet diese jedoch an anderen internen Lysinen des Ubiquitins statt, die selbst keinen Einfluß auf eine Internalisierung haben und deren Funktion in vielen Fällen bislang nicht restlos aufgeklärt ist (Weissman, 2001).

Die C-terminalen Ubi-Fusionskonstrukte zeigten sich ebenfalls in ihrer SVP Freisetzungsrates reduziert, wenngleich in unterschiedlich starker Ausprägung. Während die C-Ubi 2 Mutante sich ungefähr auf dem Niveau der N-Ubi 2 befindet, setzt die N/C-Ubi Mutante ähnlich der Δ Ubi 1-5 Mutante massiv subvirale Partikel frei. Letzteres ist insofern interessant, da diese Mutante ja in gewissem Sinne bereits diubiquitiniert ist und somit, gemäß der Literatur, weniger SVP freisetzen sollte. Möglicherweise jedoch stellt diese Mutante eine gute Erklärung für die Phänotypen K48R und K63R dar, da sie zwar diubiquitiniert ist, diese jedoch nicht über ein internes Lysin an den Positionen 48 oder 63 miteinander verbunden sind. Dafür spräche auch die untereinander vergleichbaren SVP Freisetzungsrates, die, relativ zur N-Ubi 2 Mutante, hoch sind. Denkbar wäre aber noch ein anderer Effekt, da sich der Phänotyp der C-Ubi 2 Mutante, mit einer relativ niedriger Freisetzungsrates, in der N/C-Ubi Mutante wieder aufhebt. Ein an das Hüllprotein fusioniertes Ubiquitin könnte als Signal für die Rekrutierung der Endozytosemaschinerie möglicherweise ausreichend sein. Für eine Interaktion jedoch mit den an der Internalisierung beteiligten Proteinen, und eine Aufnahme in die Zelle, wären aber freie zytoplasmatische Enden des Hüllproteins notwendig. Die Δ Ubi 1-5 Mutante wird, obgleich sie zwei freie zytoplasmatische Domänen trägt, stark von der Zelle freigesetzt, was möglicherweise an der aufgrund fehlender Ubiquitinierungen schlechten Rekrutierung der Endozytosemaschinerie liegt. N- oder C-terminale Ubiquitine jedoch, wären dann sowohl dazu in der Lage die Maschinerie anzulocken, als auch mit ihr zu interagieren, da zumindest eine zytoplasmatische Domäne einer Interaktion zugänglich wäre. Die N/C-Mutante hingegen wäre folglich relativ effizient dazu in der Lage die für die Internalisierung notwendigen Proteine zu rekrutieren, aber nicht mehr fähig mit ihnen zu interagieren. Das würde, wie beobachtet, zu einer starken Freisetzung subviraler Partikel führen.

Auch im Kontext viraler Partikel konnte eine generell erniedrigte Freisetzung für die Ubi-Fusionsmutanten im Vergleich zur Δ Ubi 1-5 Variante beobachtet werden. Besonders auffallend jedoch waren erneut die Mutanten N-Ubi2 und N-Ubi 2 F4A, wobei die F4A Mutante wiederum weniger Partikel freigesetzt hat als die N-Ubi 2 Mutante. Obgleich die N/C-Ubi Mutante sich in der Freisetzung subviraler Partikel nicht wesentlich von der Δ Ubi 1-5 Mutante unterscheiden ließ, scheint sie einen massiven Defekt in der Freisetzung viraler Partikel zu haben. Diesem Effekt liegt nicht etwa eine herabgesetzte Prozessierungsrate des Proteins zu Grunde, denn diese war in Zelllysaten mit allen anderen Proteinen vergleichbar, sondern eher ein Defekt bei der Umhüllung foamyviraler Kapside. Dies wäre möglicherweise durch eine sterische Behinderung durch die Ubiquitine an den LP und TM Domänen erklärbar, wobei es sich hierbei aber um einen kumulativen Effekt zu handeln scheint. Denn

während eine Ubiquitinierung am LP, oder an der TM Untereinheit alleine die Freisetzung viraler Partikel zwar deutlich reduziert, erscheint diese bei der Kombinationsmutante N/C-Ubi noch stärker inhibiert. Möglicherweise sind durch die stabilen Ubiquitinierungen am N- und C-Terminus die entsprechenden Domänen nicht mehr einer Interaktion mit den Gag Proteinen der FV Kapside zugänglich. Dies wäre gut denkbar für die „Budding-Domäne“ am N-Terminus, welcher die ersten 15 AS zugesprochen werden. Obgleich durch einen Glyzin/Serin-Linker eine gewisse Flexibilität in Hinsicht auf die räumliche Anordnung der einzelnen Domänen gewährleistet sein soll, kann ein negativer Einfluß durch das 74 AS große Ubiquitinmolekül nicht ausgeschlossen werden. Ähnliches gilt auch für den C-Terminus des Proteins, der ja als wichtig für die Oligomerisierung des Proteins beschrieben wurde. Alleine können diese Effekte möglicherweise bis zu einem gewissen Grade kompensiert werden, in Kombination hingegen scheint das nicht möglich zu sein.

Auch bei Infektionsanalysen erwies sich diese N/C-Kombinationsmutante, entsprechend der niedrigen Freisetzungsrates, als, mit 7% der Δ Ubi 1-5 Mutante, wenig infektiös. Die N-Ubi 2 Mutante zeigte sich, bezogen auf die Δ Ubi 1-5 Mutante, um über 65%, die F4A Mutante sogar um 75% in ihrer Infektiosität erniedrigt. Diese Infektionseffizienzen spiegeln die Verhältnisse der Freisetzungsrates wider. Ein interessanter Befund stellte sich jedoch bei der I44A Mutante ein. Obwohl sie im starken Maße virale Partikel freisetzt, sind diese nur gering infektiös, ungefähr auf dem Niveau der F4A Mutante. Dies deutet auf einen hohen Anteil defekter Partikel hin, da anhand der Gag Banden bei den entsprechenden Western Blot Analysen eine klare Freisetzung viraler Partikel nachgewiesen werden konnte. Worin dieser Defekt jedoch begründet liegt ist nicht klar. Zwar ist die Freisetzung viraler Partikel geringfügig reduziert, verglichen mit der Δ Ubi1-5 Mutante, aber dennoch in relativ hohem Maße nachzuweisen, was zumindest einen starken Defekt bei einer Interaktion mit den foamyviralen Kapsiden ausschließt.

Monoubiquitin ist mehrmals als Internalisierungssignal beschrieben worden (Terrell et al., 1998; Roth und Davis, 2000; Shih et al., 2000; Nakatsu et al., 2000). Hierbei soll es, fusioniert an ein Protein, dessen Internalisierung und Endozytose fördern, sowie funktionell dazu in der Lage sein, originale Internalisierungssignale zu ersetzen (Shih et al., 2000). Eine Variante des foamyviralen Hüllproteins, welcher alle internen Lysine innerhalb der LP Domäne fehlen, setzt im Gegensatz zum wildtypischen PFV Env massiv subvirale Partikel frei und erscheint auch in Infektionsanalysen leicht erhöht. Eine stabile Fusion von Ubiquitin an eben diese Mutante ist nicht dazu in der Lage einen dem wildtypischen Protein ähnlichen Phänotyp wieder herzustellen. Zwar sind alle Ubi/Env-Fusionsproteine in ihrer viralen, sowie subviralen Partikelfreisetzung reduziert, liegen aber stets über dem wildtypischen Protein. Auch eine Mutation der für die Internalisierung als entscheidend beschriebenen Aminosäure Phenylalanin an der Position 4 des Ubiquitins scheint nicht dessen Funktion zu beeinträchtigen. Hingegen erweist sich eine Mutante, die einen Austausch der Aminosäure Isoleuzin an Position 44 trägt, zwar nicht in der Freisetzung SVP oder viraler Partikel beeinträchtigt zu sein, dennoch sind ein mehrheitlicher Teil dieser Viruspartikel nicht mehr infektiös. Eine Kombinationsmutante, mit jeweils einem Ubiquitin an deren N- sowie C-Terminus, setzt massiv subvirale, aber kaum virale Partikel frei, und ist folglich nur schwach infektiös. Diese Befunde können die Eigenschaft von Ubiquitin als starkes Internalisierungssignal nicht, oder nur bedingt bestätigen. Möglicherweise verstärkt oder

beschleunigt eine Ubiquitinierung nur einen Prozess, der auch ohne eine solche Modifikation stattfinden würde, wie bereits von Haglund und Kollegen beschrieben (Haglund et al., 2003). Möglicherweise erfüllen die Ubiquitine eine nur nachgeschaltete Funktion bei der intrazellulären Sortierung der internalisierten Proteine und die Endozytose selbst erfolgt Ubiquitin-unabhängig (Haglund et al., 2003). Vielleicht reicht aber auch ein Monoubiquitin als effizientes Internalisierungssignal nicht aus (Barriere et al., 2006; Hawryluk et al., 2006). Da die Affinität von Ubiquitin für die UIMs der an der Endozytose beteiligten Proteine wie beispielsweise Epsin 1 oder eps15 nicht sehr hoch ist (Hawryluk et al., 2006), haben Bindungsstudien ergeben, dass diese Transport-assoziierten Proteine vermehrt polymeres Ubiquitin und nicht Monoubiquitine binden (Bonifacino, 2004; Hawryluk et al., 2006). Diese UIMs binden bevorzugt multiple Monoubiquitine, oder kurze Ketten, in Form von Oligomeren (Barriere et al., 2006). Als Modell schlagen Barriere und Kollegen (Barriere et al., 2006) vor, dass ein oder mehrere membranständige Proteine sich zu oligomeren Komplexen auf der Plasmamembran zusammenlagern, und somit auch die mehrfach ubiquitinierten zytoplasmatischen Domänen der Proteine zu einem Aggregat zusammenfinden. Ist dieser zytoplasmatische Anteil dann hinreichend ubiquitiniert und ermöglicht eine ausreichend hohe Bindungsaffinität für die entsprechenden Rezeptoren, kann eine Internalisierung stattfinden. Diese Bildung von kurzen Polyubiquitinen als Internalisierungssignal mag vor allem für die internen Lysin-Mutanten K48R und K63R von großer Bedeutung sein.

Eine Fusion von Ubiquitin von an die Δ Ubi 1-5 Mutante ist nicht dazu in der Lage einen wildtypischen Phänotypen wieder herzustellen. Das legt die Vermutung nahe, dass nicht nur ein singuläres Ubiquitin eine Determinante für eine Endozytose darstellt, sondern dass die Position des Ubiquitins innerhalb des Zielproteins möglicherweise eine entscheidende Rolle bei dessen Funktion spielt. Stanke und Kollegen (Stanke et al., 2005) war es bei Mutationen einzelner Lysine innerhalb des LP jedoch nicht möglich Unterschiede im Ubiquitinierungsmuster oder der SVP Freisetzung der Einzelmutanten zu identifizieren. In dieser Arbeit wurde ein anderer Ansatz gewählt. Basierend auf der Δ Ubi 1-5 Mutante wurden einzelnen Lysine an ihren natürlichen Positionen erneut eingeführt. Darüber hinaus wurden PFV Hüllproteinmutanten hergestellt, die in vermeintlich für die Regulation wichtigen Bereichen Lysine in nicht natürlichen Positionen tragen. Diese Hüllproteinmutanten wurden dann in Bezug auf deren virale und subvirale Partikelfreisetzung, sowie deren Infektiosität und Oberflächenexpression untersucht.

Analysen der subviralen Partikelfreisetzung ergaben einen für die Freisetzung sensiblen Bereich zwischen den Aminosäurepositionen 14 und 20. Während eine Wiedereinführung der natürlichen Lysine an den Positionen 34 und 53 keinen wesentlichen Unterschied zur Δ Ubi 1-5 Mutante offenbarte, erwiesen sich die Mutanten K14 und K15 in ihrer Effizienz SVP zu sekretieren um den Faktor 10 reduziert. Die Wiedereinführung eines Lysins an der Aminosäureposition 18 hingegen führte zu einem Phänotyp, dem keine SVP Freisetzung mehr nachzuweisen war. Bei dieser Mutante schien auch ein schwerwiegender Prozessierungsdefekt des Hüllproteins vorzuliegen, da mit LP-spezifischen Antikörpern dieses nur sehr schwach zu detektieren war. Eine reduzierte Env Prozessierung war auch bei der Mutante K15 zu beobachten, wohingegen die Mutante K14, obgleich in ihrer Freisetzung zehnfach reduziert, eine starke Prozessierung aufwies. Western Blot Analysen ergaben eine Ubiquitinierung aller untersuchten Hüllproteinvarianten, mit Ausnahme der K53

Mutante. Das Lysin an der Aminosäureposition 53 liegt der membranspannenden Domäne des Leaderpeptids recht nahe, und es ist beschrieben worden, dass solche Lysine mit großer Nähe zu Membranen nur sehr ineffizient von Ubiquitinligasen erkannt und modifiziert werden (Shih et al., 2000). Dies erklärt auch den der Δ Ubi 1-5 Mutante entsprechenden Phänotypen, da das LP der K53 Mutante folglich ebenfalls keine Modifikationen durch Ubiquitin aufweist. Aufgrund der fehlenden Freisetzung subviraler Partikel, war für die K18 Mutanten auch keine Ubiquitinierung nachweisbar.

Die K18 Mutante verdeutlicht erneut die Rolle des Ubiquitins als Regulator der foamyviralen SVP Freisetzung. Eine Inaktivierung von Lysinen führt zu einem graduellen Anstieg bei der Freisetzung von subviralen Partikeln. Eine stabile Fusion von Ubiquitin an eben jene Δ Ubi 1-5 Mutante reduziert die Sekretion wieder, welche bei der Einführung eines Lysins an der natürlichen Aminosäureposition 18 völlig zum Erliegen kommt. Bei letzterer Mutante tritt zudem noch ein Prozessierungsdefekt auf, welcher ähnlich wie bei der Δ N8 Mutante auf einen Transportdefekt hinweisen könnte. Der erstaunlich deutliche Phänotyp der K18 Mutante warf erneut die Frage auf, ob einzelne Lysine an exakten Positionen für die Ausbildung solcher Phänotypen verantwortlich sind, oder ob eine komplette Region innerhalb des PFV Env LP sensibel auf eine Ubiquitinierung reagiert. Dieser Fragestellung entsprechend wurden neue Lysin-Mutanten hergestellt, welche nicht natürliche Lysine innerhalb des LP, in einer Region um die phänotypische K18 Mutante angeordnet, tragen. Dabei handelt es sich um Mutanten mit Lysinen an den AS Positionen 16, 17, 19, 20 und 27.

Erste biochemische Analysen der subviralen Partikelfreisetzung ergaben, in einer auf das Lysat normalisierten Quantifizierung, eine für alle Mutanten nachweisbare SVP Freisetzung, wenn auch auf unterschiedlichem Niveau. Während die Mutante K16 den Mutanten K14 und K15 entsprach, lag die K17 Variante, mit 53% der Δ Ubi 1-5 Mutante, deutlich über den Freisetzungsraten der ersten drei Positionen. Auf die K17 Mutante folgt die Mutante K18, die ihrerseits keine detektierbare Menge subviraler Partikel sekretiert, gefolgt von der K19 Mutante. Diese liegt erneut auf einem der Δ Ubi 1-5 Mutante vergleichbarem Niveau, welches von der Hüllproteinvariante K20 mit über 160% noch übertroffen wird. Das eingeführte Lysin an der Aminosäureposition 27 resultiert wiederum in keinem neuen Phänotyp und entspricht der K34 Mutante. Diese Daten grenzen einen für die Regulation der subviralen Partikelfreisetzung wichtigen Bereich ein. Während Lysine an den Positionen 14 bis 16 die Freisetzung von SVP zehnfach reduziert, steigt diese an der AS Position 17 erneut um den Faktor 5 an, um danach an Position 18 unter die Nachweisgrenze zu fallen. Die Aminosäureposition 19 hingegen erweist sich mit 100% der Δ Ubi 1-5 Mutante in ihrem Phänotyp als nicht sensibel für eine Ubiquitinierung, wohingegen ein Lysin an Position 20 die Freisetzung sogar noch begünstigt und auf über 160% hebt. Diese Daten deuten daraufhin, dass die exakte Aminosäureposition 18 im LP eine wichtige Rolle bei der Regulation der SVP Freisetzung einnimmt, und diese Position in einer Region eingebettet liegt, die ihrerseits sensibel auf Ubiquitinierungen reagiert und Einfluß auf das Verhalten des Hüllproteins hat.

Zur Auswertung und Quantifizierung der PFV Hüllproteinmutanten im viralen Kontext wurden die Gag Banden als Maß genommen. Zum einen ist gezeigt worden, dass Foamyviren Gag nur dann freisetzen, wenn FV Env koexprimiert wird, d.h. keine VLPs von der Zelle sezerniert werden (Fischer et al., 1998; Baldwin et al., 1998), zum anderen sollte so einer Verfälschung der Ergebnisse durch subvirale Partikel vorgebeugt werden.

Während die Mutanten K14, K15 und K16 im Kontext subviraler Partikel in ihrer Freisetzung um den Faktor 10 erniedrigt waren, stiegen sie auf 85% bis 117% verglichen mit der Δ Ubi 1-5 Mutante. Die Mutanten K17, sowie K19 bis K53 hingegen sanken in ihren Freisetzungsraten viraler Partikel bezogen auf die Effizienz der SVP Sekretion. Die K18 Mutante hingegen setzt auch bei einer Koexpression weiterer FV Proteine keine Partikel frei und ist auch weiterhin in ihrer Prozessierung gestört. Infektionsanalysen entsprachen in ihren Werten denen der viralen Partikelfreisetzung, was einen größeren Anteil defekter Virionen für die beobachteten Phänotypen weitestgehend ausschließt. Nur die Mutanten K17 und K20 wichen in ihrer Infektiosität von der beobachteten Effizienz der viralen Partikelfreisetzung ab und erwiesen sich als etwas weniger infektiös.

Die Diskrepanz zwischen der viralen und subviralen Partikelfreisetzungsraten mancher Mutanten könnte auf eine unterschiedliche zelluläre Lokalisation des PFV Hüllproteins zurückzuführen sein. Für Ubiquitin ist bereits beschrieben worden dass es auf mannigfaltige Weise die intrazelluläre Verteilung von Proteinen dahingehend bestimmt, dass es markierte Proteine zum MVB dirigiert (Raiborg et al., 2002; Katzman et al., 2002), es für eine Degradierung in Lysosomen bestimmt (Katzman et al., 2002), oder Proteine dem proteolytischen Abbau durch das 26S Proteasom zuführen kann (Johnson et al., 1992; 1995; Thrower et al., 2000; Weissman, 2001). Darüber hinaus ist für Ubiquitin eine Funktion als Chaperon bei der Unterstützung der Faltung von reifenden Proteinen im ER und Golgi gezeigt worden (Finley et al., 1989). Dies könnte in erster Linie für die K18 Mutante ein wesentlicher Aspekt sein, da deren Prozessierung massiv gestört ist. Wenn es aufgrund von Fehlfaltungen im ER oder dem Golgi-Apparat zurück gehalten würde, und folglich nicht von Furin, oder einer Furin-ähnlichen Protease würde prozessiert werden können (Duda et al., 2004), wäre dies ein möglicher Grund für die nicht nachweisbare SVP Sekretion. Eine veränderte intrazelluläre Verteilung könnte auch bei der K14 Mutante den Phänotyp erklären. Da diese Mutante, obgleich sie effizient prozessiert wird, vergleichsweise wenig subvirale Partikel, aber viele Viruspartikel sekretiert, könnte eine Interaktion mit Gag möglicherweise einen vorhandenen Transportdefekt teilweise aufheben. Denkbar wäre, dass die K14 Mutante im TGN verbleibt, und schließlich über den lysosomalen Abbauweg degradiert wird. Sind aber PFV Kapside in der Zelle vorhanden könnte eine Interaktion und eine Umhüllung dieser Kapside die Freisetzung der Partikel bedingen. Möglicherweise wird diese Knospung und Freisetzung durch die im PFV Gag enthaltenen L-Domänen (Stange et al., 2005; Mannigel et al., 2007) induziert. Dies gälte dann auch für die Mutanten K15 und K16. Eine veränderte intrazelluläre Verteilung könnte für die anderen Phänotypen die Interaktion zwischen Gag und Env negativ beeinflussen, und somit die virale Partikelfreisetzung reduzieren.

Bei der N-Glykosylierungsmutante Δ N8 konnte bereits ein Transportdefekt an die Zelloberfläche nachgewiesen werden. Diese Mutante erwies sich als nicht infektiös und zeigte einen massiven Defekt in der Prozessierung des Vorläuferproteins gp130^{Env}. Phänotypisch ähnelt diese Mutante der Δ Ubi 1-5 K18 Mutante, weswegen auch diese im Hinblick auf ihre Oberflächenexpression untersucht wurde. Bei einer selektiven Oberflächenbiotinylierung konnte die Expression des foamyviralen Vorläuferproteins für die alle untersuchten Mutanten, sowie für den Wildtyp gezeigt werden. Eine biotinylierte Form der SU, sowie der TM Untereinheit, jedoch konnte alleine für die K18 Mutante nicht detektiert

werden. Die Gesamtproteinexpression hingegen war für alle Proteine auf vergleichbarem Niveau nachweisbar. Auch bei einer Koexpression von PFV Gag und Pol konnte keine Oberflächenexpression der K18 Spaltprodukte detektiert werden, obgleich die Gesamtoberflächenexpression in diesem Fall etwas erhöht war. Besonders deutlich wird dies bei der K14 Mutante, was auf eine Rettung des Hüllproteins durch die Anwesenheit von PFV Kapsiden hindeutet und die bereits erwähnte These unterstützt.

Diese fehlende Oberflächenexpression der K18 Prozessierungsprodukte weist deutlich auf einen Defekt des Transports der Mutante an die Oberfläche hin. Bezieht man in diese Betrachtung noch den Wirkungsort von Furin oder einer Furin-ähnlichen Protease ein, liegt der Schluß nahe, dass die K18 Mutante im ER oder im cis-Golgi-Bereich stecken bleibt. Im Gegensatz zur $\Delta N8$ Mutante, bei welcher dem Transportdefekt sehr wahrscheinlich eine fehlende oder nicht korrekte Gesamtglykosylierung zu Grunde liegt, sind bei der K18 Mutante zwei denkbare Szenarien möglich. Der Transportdefekt an die Plasmamembran könnte in einer fehlenden Prozessierung begründet liegen. Das Protein würde auf dem Weg an die Zelloberfläche durch eine veränderte Ubiquitinierung und Prozessierung im MVB falsch sortiert und degradiert werden. Eine andere Möglichkeit wäre, dass eine Prozessierung gar nicht erst stattfindet, da das Protein das ER aufgrund von Fehlfaltungen nicht verlässt und folglich im TGN nicht prozessiert werden kann und durch das Proteasom degradiert wird.

Eine so direkte Interaktion zwischen Ubiquitin und einem viralen Hüllprotein in Bezug auf dessen intrazelluläre Verteilung und Freisetzung viraler, bzw. subviraler Partikel ist, meines Wissens, bislang nicht nachgewiesen worden. Zwar ist sowohl für HIV (Bültmann et al., 2000) als auch für Hantavirus (Geimonen et al., 2003) eine Ubiquitinierung des Hüllproteins beschrieben worden, diese führte aber in beiden Fällen zu einer Degradierung durch das Proteasom. Besonders bei Hantaviren reguliert eine Ubiquitinierung die Stabilität und die Gesamtmenge des Proteins innerhalb infizierter Zellen. Eine durch Mutation bedingte Blockade der G1 Hüllprotein Ubiquitinierung führt zu einer ansteigenden Expression sowie einer dreifach längeren Halbwertszeit der Proteine. Die biologische Relevanz liegt wahrscheinlich in der verminderten Oberflächenexpression dieser wildtypischen Hüllproteine, die es den Viren ermöglicht dem Immunsystem länger zu entgehen, indem weniger virales Antigen auf der Zelle präsentiert wird (Geimonen et al., 2003). Im Vergleich zur ΔUbi 1-5 Mutante wird auch das wildtypische PFV Env Protein in relativ geringem Maße auf der Zelloberfläche exprimiert. Dies liegt zum einen an dem ERRS (Goepfert et al., 1995; 1997; 1999), zum anderen möglicherweise ebenfalls an einer Ubiquitinierung. Das bedeutet, dass sowohl bei HIV als auch bei Hantaviren eine Ubiquitinierung zu einer Degradierung des Proteins führt, bei Foamyviren jedoch möglicherweise nur zu einer verringerten Oberflächenexpression und intrazellulären Retention.

Die Fusion eines Ubiquitins an die ΔUbi 1-5 Mutante ist nicht in der Lage einen dem wildtypischen PFV Hüllprotein entsprechenden Phänotyp zu erzeugen. Wenngleich die Sekretion subviraler Partikel reduziert ist, ist sie dennoch deutlich nachweisbar und liegt somit über der des Wildtyps. Die Fusion mutierter Ubiquitine, welche die Lysine an den Positionen 48 und 63 ersetzt hatten, setzten mehr SVP als die N-Ubi 2 Mutante frei. Möglicherweise ist die Bildung von kurzen Polyubiquitinketten über eben jene Aminosäuren entscheidend. Eine Mutation der für die Internalisierung als wichtig beschriebenen

Aminosäuren F4 und I44 innerhalb der Ubiquitins, führten im Falle der F4A Mutante zu einer weiteren Reduktion der SVP Freisetzung. Dies widerspricht der von Shih und Kollegen (Shih et al., 2000) postulierten Funktion der Aminosäure Phenylalanin, da die Mutation nicht zu einem Anstieg der Sekretion subviraler Partikel führte. Eine C- wie N-terminal mit Ubiquitin fusionierte Variante erwies sich in der Freisetzung viraler Partikel deutlich herabgesetzt. Dies liegt möglicherweise in einer gestörten Interaktion zwischen Gag und Env begründet. Eine einzelne Wiedereinführung von Lysinen in die Δ Ubi 1-5 Mutante führte im Falle der K18 Mutante zu einem deutlichen Phänotyp. Während andere Mutationen in diesem Bereich sich sowohl positiv, wie auch negativ auf die virale und subvirale Partikelfreisetzung auswirkten, konnte für diese Mutante keinerlei Freisetzung mehr nachgewiesen werden. Dieser Befund, genau wie die geringe Prozessierung des Proteins, verdeutlicht die Sensibilität des Hüllproteins in Bezug auf dessen Ubiquitinierung. Die Regulation einer Freisetzung von subviralen Partikeln scheint bei Foamyviren also im hohen Maße von Ubiquitin abzuhängen. Hierbei erweisen sich diese Regulationsmechanismen aber als äußerst komplex. Während bei allen Mutationen noch eine SVP Sekretion nachweisbar war, kam diese bei der K18 Mutante gänzlich zum Erliegen. Möglicherweise ist die Rückhaltung und korrekte Prozessierung des Proteins hochgradig von einem Zusammenspiel zwischen Ubiquitinierung und Glykosylierung abhängig. Dabei scheint sowohl die Anzahl der Ubiquitine, als auch die exakte Position entscheidend zu sein. Dieses „Fine-Tuning“ der Regulation ließe sich wahrscheinlich nur durch Kombinationen aus Glykosylierungs- und Lysin-Mutanten, sowie einer Koexpression weiterer foamyviraler Proteine genauer erschließen. Die Arbeit mit Ubiquitin jedoch ist relativ diffizil, da es auf mannigfaltige Weise wirkt, intern über Lysine weiter ubiquitiniert werden kann, was wiederum das Schicksal der markierten Proteine zu verändern vermag. Eine Depletion zellulären Ubiquitins wäre in vielen Fällen eine aufschlussreiche Methode den Transport solcher Mutanten in „Pulse-Chase-Analysen“ zu verfolgen und mit den entsprechenden wildtypischen Varianten zu vergleichen. So eine Reduktion des zellulären Ubiquitin-Levels jedoch hat massive Auswirkungen auf alle Zellfunktionen, was die Aussagekraft dieser Versuche wiederum einschränken würde.

Obwohl wenige Studien über eine direkte Interaktion zwischen Ubiquitin und viralen Hüllproteinen existieren, spielt Ubiquitin eine wichtige Rolle Replikationszyklus vieler Virusarten. So konnten für HIV und SIV beispielsweise relativ große Mengen ungebundenen Ubiquitins in viralen Partikeln nachgewiesen werden (Ott et al., 1998). Auch wird das p6 Protein von HIV Gag hochspezifisch ubiquitiniert was auf eine bestimmte Funktion hinweist, denn Lysine innerhalb der NC Domäne bleiben ohne eine Modifikation (Ott et al., 1998). Neuere Studien jedoch haben ergeben, dass eine Ubiquitinierung des HIV Gag Proteins an den Membranen während der Morphogenese, wahrscheinlich in erster Linie als direkte Folge der Membranassoziation und weniger durch das PTAP-Motiv initiiert wird (Jäger et al., 2007). Auch bei HBV spielt Ubiquitin eine wichtige Rolle während der Morphogenese. Wahrscheinlich werden die Kapsidproteine ebenfalls in geringem Maße ubiquitiniert. Diese Ubiquitine werden dann über die UIM der γ 2-Adaptine gebunden, welche im Komplex mit den Hüllglykoproteinen vorliegen. Diese Interaktionen ermöglichen dann eine Knospung in den Golgi-Apparat. Die Viruspartikel werden schließlich über den MVB durch Exozytose von der Zelle freigesetzt (Rost et al., 2006). Möglicherweise spielt bei Foamyviren die mit den

Kapsiden interagierende E3 Ligase Nedd4 eine ähnliche Rolle und fungiert als funktionelle Brücke zwischen den Kapsiden und den zytoplasmatischen Domänen des Hüllproteins.

Der Befund eines Transportdefektes der N-Glykosylierungsmutante $\Delta N8$, sowie der ΔUbi 1-5 K18 Mutante, konnte auch in der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie bestätigt werden. Während bei der Transfektion eines wildtypischen PFV Env-Expressionsplasmids genauso wie bei einer Transfektion der ΔUbi 1-5 Mutante eine massive Synzytiabildung zu beobachten war, erschienen die Zellen, die mit der K18 oder der $\Delta N8$ Mutante transfiziert, waren stets vereinzelt. Davon ausgehend, dass eine Prozessierung im Golgi-Apparat stattfindet, und dass fehlgefaltete, oder unkorrekt prozessierte Proteine nicht die Plasmamembran erreichen, lassen sich diese Ergebnisse gut erklären. Die Fusion von Membranen benachbarter Zellen ist abhängig von der Anwesenheit viraler Hüllproteine in der Plasmamembran. Bleiben diese aber während des Transportes aufgrund eines Defektes auf ihrem intrazellulären Weg stecken, kann keine Verschmelzung von Nachbarzellen erfolgen. Mit diesen Ergebnissen lassen sich die biochemisch gewonnenen Befunde noch unterstreichen. Jene Hüllproteine, die keine oder eine nur stark reduzierte Prozessierung aufweisen, sind nicht mehr in der Lage virale Partikel zu sezernieren. Für die K18 Mutante gilt dies auch im Kontext subviraler Partikel. Darüber hinaus konnte durch Oberflächenbiotinylierungen keine Expression dieser Mutanten auf der Plasmamembran transfizierter Zellen nachgewiesen werden. Dieser Aspekt wird durch die fehlende Synzytiabildung noch unterstützt. So konnte mit einem bildgebenden Verfahren ein direkter Nachweis erbracht werden, wohingegen die biochemischen Analysen stets indirekte Nachweismethoden darstellen.

Eine Kolokalisationsanalyse ausgewählter Mutanten mit bestimmten zellulären Kompartimenten sollte es folglich auch ermöglichen eine Aussage darüber zu treffen, wo, bzw. in welchem Kompartiment die Proteine stecken bleiben. Die dafür verwendeten PFV Env Proteine wurden hierfür N-terminal mit einem monomeren, rot-fluoreszierenden Protein (mCherry) fusioniert (Stirnengel, unveröffentlicht).

Die Kotransfektion Cherry-fusionierter PFV Hüllproteinmutanten mit VLP18, einem Marker für das endoplasmatische Reticulum (Rolls und Rapoport, 1999) belegte eine ER Lokalisation für alle Hüllproteinvarianten. Die vom Wildtyp abgeleiteten Varianten (Cherry-wt, Cherry-SU/TM) wiesen eine nahezu komplette Kolokalisation auf, scheinen also im gesamten ER lokalisiert zu sein, wohingegen die auf der ΔUbi 1-5 basierenden Mutanten eine geringfügig abweichende Verteilung zeigten. Obgleich auch bei diesen Varianten eine starke Kolokalisation mit den angefärbten ER Bereichen zu beobachten war, ließen sich Env Proteine auch außerhalb des ER nachweisen. Zwischen den Mutanten Cherry- ΔUbi 1-5 und Cherry-K18 waren keine eindeutigen Unterschiede zu erkennen. Diese Befunde einer ER Lokalisation waren insofern zu erwarten, da die foamyvirale Hüllproteine in das ER synthetisiert werden. Die Unterschiede zwischen den auf dem Wildtyp basierenden und den von der ΔUbi 1-5 Mutanten abgeleiteten Mutanten könnte aber auch auf eine inhomogene Anfärbung des ER-Kompartiments zurückzuführen sein. Dieses zelluläre Kompartiment ließ sich in allen Versuchen, sowie mit verschiedenen Markern (Daten nicht gezeigt) stets nur schlecht, bzw. nicht gleichmäßig anfärben. Möglicherweise liegt dies in der weiten Ausbreitung dieser Struktur innerhalb der Zelle begründet.

Anders stellte sich die Kolokalisation mit dem Golgi-Apparat dar. Bei allen PFV Env Fusionsproteinen konnte eine vollständige Kolokalisation der Hüllproteine mit den anfärbbaren Golgi-Strukturen zeigen. Dabei war kein Unterschied zwischen den einzelnen Mutanten identifizierbar. Nur bei jenen, die eine Synzytiabildung induzieren, erschienen die Golgi-Apparate in ihrer Struktur aufgelöst und weniger kompakt. Dies allerdings liegt wahrscheinlich direkt in der Eigenschaft der Synzytiainduktion begründet. Denn es erscheint wahrscheinlich, dass bei einer Verschmelzung zellulärer Membranen nicht alleine die Plasmamembran beteiligt ist, sondern auch im hohen Maße die intrazellulären Membranen. Gerade im Hinblick darauf, dass Foamyviren in erster Linie intrazellulär knospen und somit Hüllproteine in intrazellulären Membranen vorliegen müssen. Eine solche Verschmelzung könnte zur Auflösung der intrazellulären Architektur der Zelle, und somit zu Veränderung der morphologischen Merkmale führen.

Oberflächenbiotinylierungen haben gezeigt, dass auf der Oberfläche PFV Env transfizierter Zellen eine gewisse Menge Vorläuferprotein nachzuweisen ist. Möglicherweise erfolgt eine Prozessierung und Reifung erst nach einer erneuten Aufnahme der Proteine in die Zelle. Denkbar wäre aber auch, dass nur ein Teil der Proteine auf der Zelloberfläche präsentiert wird, um möglicherweise dem Immunsystem ein nicht Zell-eigenes Antigen zu präsentieren. Dies aber müsste über einen alternativen Weg an die Oberfläche gebracht werden, da eine korrekte Prozessierung und Glykosylierung als essentiell für den Transport an die Oberfläche beschrieben wurde (Brewer und Corley, 1996; Dash et al., 1994; Fenouillet et al., 1995; Schultz und Oroszlan, 1979; Rein et al., 1982). So erscheint die Oberflächenexpression eines Proteins als sehr dynamischer Prozess, bei welchem die Internalisierung über Endozytose ein wesentlicher Schritt ist. Die unterschiedlich starke Oberflächenexpression des wildtypischen PFV Hüllproteins, der Δ Ubi 1-5 Mutante und der K18 Mutante ließe sich zum einen durch einen Transportdefekt, aber möglicherweise auch noch über eine voneinander abweichende Endozytoserate erklären. Um dieser Fragestellung nach zu gehen, wurden Kolokalisationsstudien mit Rab5 und Rab7, Markern der frühen und späten Endosomen durchgeführt (Rab5: Gorvel et al., 1991; Zerial und McBride, 2001; Alberts, 2004; Rab7: Feng et al., 1995; Vitelli et al., 1997; Alberts, 2004). Rab Proteine sind monomere GTPasen mit einer charakteristischen Verteilung auf intrazellulären Membranen, wobei jedes Zellorganell mindestens ein eigenes Rab Protein enthält (Alberts, 2004). Diese Familie von Membranproteinen ist an der spezifischen Verschmelzung von Vesikeln mit ihren Zielmembranen beteiligt, dadurch dass sie eine Interaktion der v-SNAREs mit den komplementären t-SNAREs erleichtern (Zerial und McBride, 2001; Alberts, 2004). Endosomen sind ein heterogenes Kompartiment aus Membranschläuchen, welches sich von der Zellperipherie bis zu einer Region in der Nähe des Zellkerns erstreckt. Frühe Endosomen (Rab5) sind zumeist direkt unterhalb der Plasmamembran zu finden und erscheinen tubulär, wohingegen späte Endosomen (Rab7) in einer perinukleären Region eher spärlich sind und eine multivesikuläre Erscheinung (MVB) haben (Katzman et al., 2002; Alberts, 2004). Allgemein bilden frühe Endosomen die wichtigste Sortierstelle für Proteine auf dem endosomalen Transportweg, von welcher zum einen Proteine zurück an die Plasmamembran oder zum Golgi-Apparat transportiert, oder einem lysosomalen Abbau in späten Endosomen, bzw. Lysosomen zugeführt werden (Katzman et al., 2002; Alberts, 2004). Teile der frühen Endosomen wandern während ihrer Reifung zu späten Endosomen

entlang von Mikrotubuli in Richtung Zellkern und schnüren dabei beständig „Recycling-Vesikel“ nach außen, sowie Vesikel in ihr Inneres ab. Dies geht einher mit einer beständigen Ansäuerung des Lumens durch Protonenpumpen in der limitierenden Membran der MVB und schließlich mit einer Fusion Hydrolase-haltiger Vesikel aus dem TGN, dem Ausbilden eines Lysosoms (Alberts, 2004). Membranproteine, die in die inneren Vesikel des MVB sortiert werden sollen, erhalten als Signal für diesen Transport eine Modifizierung durch Ubiquitin, und werden somit dem lysosomalen Abbau zugeführt (Dupre und Haguenauer-Tsapis, 2001; Losko et al., 2001; Alberts, 2004).

Analysen betreffend der Kolo-kalisation mit frühen Endosomen ergaben für die vom Wildtyp abgeleiteten Fusionsproteine vor allem in der Peripherie der Zelle eine relativ starke Kolo-kalisation. Die Cherry-fusionierte Δ Ubi 1-5 Variante zeigte eine nur sehr geringe Lokalisation in den frühen Endosomen. Die K18 abgeleitete Mutante hingegen lag in ihrer Kolo-kalisationsrate zwischen dem Wildtyp und der Δ Ubi 1-5 Mutante, wobei diese eher in der Nähe des Zellkerns und weniger direkt an der Plasmamembran stattfand. Die Spaltstellen Mutanten hingegen, unabhängig davon ob sie vom Wildtyp oder der K18 Mutante abgeleitet sind, wiesen eine starke Kolo-kalisation mit Rab5 auf, aber auch verstärkt in der Nähe des Zellkerns. Ob dies auf eine fehlende Prozessierung und somit eine veränderte intrazelluläre Transportroute zurückzuführen ist, ist nicht klar, denn die Spaltstellenmutante im wildtypischen Kontext, ist in der Freisetzung viraler Partikel nicht von der wildtypischer Env Proteine zu unterscheiden. Die geringe Kolo-kalisation mit Rab5 Kompartimenten für die Cherry- Δ Ubi 1-5 Mutante ist möglicherweise auf eine verringerte Endozytoserate zurückzuführen. Zum einen setzt sie stark SVP frei, was auf einen fehlenden Rückhalte-mechanismus schließen lässt, zum anderen wird sie stark auf der Oberfläche transfizierter Zellen exprimiert. Möglicherweise wird diese Mutante an die Plasmamembran transportiert und die fehlende Ubiquitinierung bewirkt, dass keine erneute Internalisierung stattfindet und folglich die Mutante in hohem Maße von der Zelle abgeschnürt wird. Das veränderte Ubiquitinierungsmuster scheint hierbei ein deutlich stärkeres Signal als das von Goepfert und Kollegen (Goepfert et al., 1995; 1997; 1999) vorgeschlagene ERRS zu sein, was zu keiner, oder einer nur geringen Retention des Proteins im ER, und durch den Austausch aller Lysine, als Akzeptor für Ubiquitin (Stanke et al., 2005), zu keiner Internalisierung des Proteins an der Zelloberfläche führt.

Eine Kolo-kalisation mit Rab7 enthaltenden Kompartimenten konnte ebenfalls für alle Mutanten gezeigt werden, wenngleich auch mit unterschiedlicher Intensität. Während die Cherry- Δ Ubi 1-5 Mutante eine nur relativ schwache Kolo-kalisation mit späten Endosomen zeigte, was einer erniedrigten Endozytose entspräche, wiesen alle anderen Mutanten, basierend auf dem Wildtyp und der K18 Mutante, eine starke Lokalisation in diesem Kompartiment auf. Besonders auffallend jedoch war dies bei der Cherry-K18, sowie deren Spaltstellen-Kombinationsmutante. Diese Hüllproteinform wird möglicherweise, aufgrund der fehlenden Prozessierung und einer eventuellen Fehlfaltung vom Golgi-Apparat aus in die späten Endosomen dirigiert, um dort über den lysosomalen Abbauweg degradiert zu werden. Ein Abbau durch das Proteasom direkt nach dem ER erscheint relativ unwahrscheinlich, da durch eine Kolo-kalisationsanalyse nachgewiesen werden konnte, dass sich die K18 Mutante im Golgi-Apparat befindet. Ein möglicher Transport vom ER über den Golgi-Apparat hin zu

späten Endosomen und Lysosomen würde auch die fehlende Oberflächenexpression dieser Mutante erklären können.

Yu und Kollegen (Yu et al., 2006) konnten PFV Kapside durch Studien mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie am MTOC nachweisen, ähnliches gelang Lindemann und Mitarbeitern für das foamyvirale Hüllprotein (persönliche Mitteilung). Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ergaben ebenfalls eine perinukleäre Lokalisation der foamyviralen Hüllproteine, weshalb eine Koexpressionsanalyse mit den PFV Proteinen Gag und Pol weitere Aufschlüsse über den Ort der Partikelmorphogenese geben sollten, bzw. darüber, ob die K18 Mutante noch zu einer Interaktion mit PFV Kapsiden in der Lage ist. Für diese Untersuchungen wurden fusionierte SU/TM Spaltstellenmutanten auf Basis des Wildtyps, der K18 Mutante sowie einer Tryptophanmutante ($W_{13,15}$) hergestellt (Stirnnagel, unveröffentlicht). Diese Mutanten sollten sicherstellen, dass die intrazelluläre Architektur der transfizierten Zellen nicht durch eine Env-vermittelte Fusion der Kompartimentmembranen zerstört wird. Die auf dem Wildtyp basierende SU/TM Spaltstellenmutante wies eine deutliche Aggregatbildung in der Peripherie der Zelle auf, was Viruspartikel sein könnten, die sich in Exosomen befinden. Ein ähnlicher Befund wurde auch für HIV und MLV Kapside gezeigt (Sherer et al., 2003). Für die von der K18 abgeleitete Mutante war eine diffuse Verteilung sowohl von Env als auch von Gag in einer Kern-nahen Region zu beobachten. Ähnliches war auch bei der Tryptophanmutante zu sehen, was eine funktionelle Interaktion in diesen Kompartimenten unwahrscheinlich macht. Möglicherweise befinden sich beide Proteine unabhängig voneinander in einer Region welche einem späten Endosom oder dem MVB Kompartiment entspricht, wobei eine Interaktion und Morphogenese nicht stattfinden kann. Dies könnte für die K18 Mutante an einer fehlenden Prozessierung zwischen den LP und SU Untereinheiten liegen, da diese für eine Morphogenese als essentiell beschrieben wurde (Duda et al., 2004). Möglicherweise ist das späte endosomale oder das MVB Kompartiment der eigentliche Ort der PFV Partikelknospung, wie auch für MLV beschrieben (Sherer et al., 2003). Dieser Befund konnte bei MLV noch durch EM-Aufnahmen bestätigt werden, die zeigten, dass eine Kolokalisation und Knospung bereits an späten Endosomen ($Lmp1^+$) beginnt, und die multivesikulären Körperchen angefüllt mit Viruspartikeln sind (Sherer et al., 2003). Die Autoren stellen die These auf, dass die beobachtete Kolokalisation von MLV Gag und Env in späten Endosomen nicht das Resultat einer Endozytose ist, sondern vielmehr scheint es der Einstieg in den Transportweg der Viruspartikel an die Zelloberfläche zu sein. Weiterhin argumentieren die Autoren, dass eine intrazelluläre Knospung auf nicht als absolut anzusehen ist, und eine Knospung über die Plasmamembran keinesfalls ausschließt. Möglicherweise spielen die Ubiquitinierungen hierbei eine wichtige Rolle, da sie bereits als Sortierungssignal in die MVB beschrieben worden sind (Dupre und Hagenauer-Tsapis, 2001; Losko et al., 2001; Alberts, 2004). Eine Ubiquitinierung kann aber nicht die einzige Determinante sein, da die ΔUbi 1-5 Mutante in ihrer Partikelfreisetzung, verglichen mit dem wildtypischen PFV Env, zweifach erhöht ist, die K18 Mutante jedoch keine Partikel mehr freisetzt.

Ogleich die Mutanten sich in biochemischen Analysen als sehr unterschiedlich erwiesen haben, ließen mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie nur schwerlich deutliche Unterschiede herausarbeiten. Dies mag zum Teil an der Physiologie der Zelle liegen. Denn alle in der Zelle exprimierten Proteine, seien sie nun für den Abbau in Lysosomen oder dem Proteasom

vorgesehen, oder auf dem Weg zur Plasmamembran, oder von dieser erneut zurück in die Zelle, liegen zum Zeitpunkt der Fixierung in der Zelle vor. Das bedeutet, dass vielerlei zelluläre Strukturen, die am Transport von Proteinen beteiligt sind Hüllproteine beherbergen. Dies macht es schwer Unterschiede zu identifizieren. Eine Möglichkeit diesem Problem zu begegnen wäre die Behandlung der Zellen mit Cycloheximid, einem Inhibitor der Proteinsynthese. Damit könnten zwei Fragen geklärt werden. Zum einen könnte nach Zugabe des Inhibitors beobachtet werden wie und wohin die vorhandenen Proteine transportiert werden, ohne dass neue Hüllproteine synthetisiert werden. Das würde Aussagen über die Kinetik und die Art des Transports erlauben. Zum anderen könnte eine Inkubation transfizierter Zellen mit Cycloheximid unterbrochen, und somit das Schicksal der neu-synthetisierten Proteine nachvollzogen werden.

Darüber hinaus haben neuere Studien in unserem Labor (Stirnnagel, persönliche Mitteilung) ergeben, dass mCherry alleine bereits von der Zelle sezerniert wird. Obgleich bislang nicht gänzlich geklärt ist, ob diese Proteine in Form von Vesikeln oder als reine Proteine abgegeben werden, deuten Anzeichen daraufhin, dass es sich hierbei um vesikuläre Strukturen handelt. Diese Tatsache erschwert die Beurteilung der erzielten Befunde, besonders im Falle der K18 Mutante, da gerade diese in ihrer intrazellulären Verteilung und Expression, bzw. Prozessierung beeinträchtigt ist. Ein im mCherry möglicherweise enthaltenes Exportsignal würde die phänotypische Ausprägung dieser Mutante in der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie erheblich beeinflussen. Dennoch konnte gerade für die Δ Ubi 1-5 Mutante ein deutlicher Unterschied zur wildtypischen Hüllproteinvariante im Bezug auf die Kolo-kalisation mit endosomalen Strukturen gezeigt werden. Diese diskutierten Ergebnisse erscheinen trotzdem wahrscheinlich, gerade weil sie den biochemisch erzielten Ergebnissen entsprechen.

Das foamyvirale Hüllprotein hat sich in biochemischen Untersuchungen als sehr sensibel im Hinblick auf Modifikationen erwiesen. So erwiesen sich manche der konservierten N-Glykosylierungsstellen als absolut notwendig für eine korrekte Prozessierung des Proteins. Auch scheint der Transport aus dem ER an die Oberfläche stark von der richtigen Konformation abhängig zu sein. Die Mutation einzelner NGS, sowie deren flankierende Aminosäurebereiche ergaben Phänotypen, die nicht mehr in der Lage waren Partikel frei zu setzen oder eine Infektion zu etablieren. Darüber hinaus konnte eine temperaturabhängige Variante identifiziert werden, die wahrscheinlich auf Faltungsdefekten beruht, die bei niederen Temperaturen wieder aufgehoben werden können. Die Ubiquitinierung des Leaderpeptids hingegen spielt eine maßgebliche Rolle bei der Regulation der Freisetzung von sowohl viralen, als auch subviralen Partikeln. Die sequenzielle Einführung einzelner Lysine im LP ergab Mutanten, die in ihrer phänotypischen Ausprägung meist zwischen dem Wildtyp und einer Mutante lagen, die keine Lysine mehr in ihrer Aminosäuresequenz des Leaderpeptids trägt.

Die biologische Regulation der Synthese und Funktion von Glykoproteinen ist in hohem Maße komplex, was durch die vorliegenden Studien auch für das PFV Hüllprotein gezeigt werden konnte. Eine gentechnische Herangehensweise über das Einführen von Mutationen in Gensequenz von Proteinen birgt viele Vorteile, wirft aber dennoch immer wieder neue Fragen auf. So können beispielsweise einzelne Bereiche definiert werden, die für bestimmte Funktionen essentiell sind, die tatsächliche Wirkungsweise allerdings bleibt oftmals

verborgen. Die regulatorischen Mechanismen die der Reifung, der Prozessierung und dem Transport von Proteinen zu Grunde liegen lassen sich nur schwer im direkten Fall identifizieren. So ist der Umgang beispielsweise mit Ubiquitin sehr schwierig, da es an vielen zellulären Vorgängen beteiligt ist und in vielerlei Hinsicht seine Wirkung entfalten kann. Auch können Studien *in vitro* stets nur als Erklärungsmodell fungieren, da sich die Physiologie eines Organismus deutlich von den Bedingungen einer Zellkulturschale unterscheiden. Dies wird deutlich bei der Funktion von Zuckerschilden viraler Hüllproteine, die in Zellkultur entbehrlich erscheinen, *in vivo* jedoch die Pathogenität des Virus entscheidend bedingen.

Trotzdem liefern die Ergebnisse aus *in vitro* Versuchen wesentliche Erkenntnisse über die Biologie von Viren und deren Proteinen. Die korrekte N-Glykosylierung des foamyviralen Hüllproteins ist essentiell und vor allem hochspezifisch für die Reifung und Prozessierung des Proteins. Ganz besonders im Hinblick auf die Fähigkeit virale Kapside zu umhüllen. Ähnliches gilt für das Ubiquitinierungsmuster, dessen Regulation deutlich komplexer erscheint. Das Ersetzen einzelner Lysine führt zu „Schwarz-Weiß“-Antworten, die in ihrer Feinabstimmung stets von der des Wildtyps abweichen. Hierbei scheint Ubiquitin sowohl als Endozytosesignal, Sortierungssignal, als auch als Chaperon am Schicksal der foamyviralen Env Proteins beteiligt zu sein.

5 Zusammenfassung

Die Familie der *Retrovirinae* wird in zwei Unterfamilien untergliedert, die *Orthoretrovirinae* und die *Spumaretrovirinae*. Foamyviren stellen aufgrund einiger besonderer Eigenschaften die einzigen Vertreter dieser Unterfamilie, die sie als Bindeglied zwischen den Retroviren und den Hepadnaviren erscheinen lassen. So erfolgt beispielsweise die reverse Transkription des viralen Genoms nicht erst nach Eintritt in die Zielzelle, sondern, anders als bei Orthoretroviren, bereits in der Produzentenzelle noch während oder kurz nach der Morphogenese. Diese Eigenschaft teilen Foamyviren mit den Hepadnaviren ebenso wie die obligate Koexpression der Kapsidproteine mit den viralen Hüllproteinen für die Freisetzung von Viruspartikeln. Im Gegensatz zu Orthoretroviren sind Foamyviren folglich nicht in der Lage virusähnliche Partikel (VLP) zu sekretieren und die spezifische Funktion des PFV Env Proteins kann nicht durch heterologe Hüllproteine übernommen werden.

Die Synthese des PFV Env Vorläuferproteins erfolgt am rER, wobei es eine Typ III Membrantopologie erhält, mit sowohl dem N- als auch dem C-Terminus im Zytoplasma. Während des Transports des Proteins zum Ort der Partikelknospung, wird es posttranslational im Golgi-Apparat, oder dem trans-Golgi Netzwerk, durch Furin oder eine Furin-ähnliche Protease in drei partikelassoziierte Untereinheiten prozessiert. Eine Partikelassoziation retroviraler Signalpeptide ist bislang nur für Foamyviren nachgewiesen worden, genauso wie eine essentielle Rolle dieses Proteins bei der Interaktion zwischen dem Kapsid und dem trimeren Hüllproteinkomplex während der Virusmorphogenese, weshalb man in der Literatur auch von einem Leaderpeptid (LP) spricht.

Eine weitverbreitete Modifikation von Proteinen im ER und dem Golgi-Apparat ist die Glykosylierung, bei welcher an definierten Aminosäuresequenzen Oligosaccharide angehängt werden. Diese Zuckergruppen bedingen in vielerlei Weise eine korrekte Faltung, Prozessierung, sowie den Transport eines Glykoproteins an den jeweiligen Zielort. Das PFV Hüllprotein beherbergt 15 potentielle N-Glykosylierungsstellen (NGS), zwei davon im LP, zehn in der SU sowie drei in der TM Untereinheit, und es ist bereits eine massive Glykosylierung dieses Proteins gezeigt worden. Analysen ergaben eine Modifikation von vierzehn NGS, nur die erste, die intrazellulär lokalisiert ist, verbleibt nicht-glykosyliert. Durch weitere Mutationsanalysen konnte dargelegt werden, dass drei von fünf evolutionär konservierten NGS für eine korrekte Biosynthese und Funktion des Hüllproteins unabdingbar sind. Hierbei erwies sich die 8. NGS als besonders auffällig. Eine Inaktivierung dieses N-Glykosylierungssignals resultiert in einer Mutante, die weder prozessiert wird, noch dazu in der Lage ist PFV Partikel zu umhüllen, und folglich keine nachweisbare Infektiosität mehr besitzt. Ähnliche Phänotypen, wenn auch nicht so ausgeprägt, zeigten Mutanten der 13. und 15. NGS. Bei letzterer erwies sich die Region um das Motiv als sensibel für Aminosäureaustausche, wohingegen bei den anderen beiden Mutanten in erster Linie die fehlende Zuckerkette für die Ausprägung der Phänotypen verantwortlich war. Für diese Mutante konnte auch eine temperaturabhängige Steigerung der Infektiosität gezeigt werden, was bereits für andere Retroviren beschrieben wurde.

Eine weitere Modifikation von Proteinen ist die Ubiquitinierung. Diese entscheidet, abhängig vom oligomeren Zustand, das Schicksal von Proteinen. So markiert Ubiquitin beispielsweise Proteine für den proteasomalen Abbau, oder dient als Signal für den intrazellulären Transport. Darüber hinaus ist Monoubiquitin als Determinante für die

Internalisierung von membranständigen Proteinen beschrieben worden. Eine PFV Hüllproteinvariante, die Δ Ubi 1-5 Mutante, trägt alle fünf Lysine im LP durch Arginine ersetzt und kann aus diesem Grund nicht mehr ubiquitiniert werden. Im Gegensatz zum wildtypischen PFV Env setzt diese Mutante, trotz eines ER Retrieval Signals, massiv subvirale Partikel frei, und erweist sich im 2-Plasmid-System als leicht infektiöser als der Wildtyp. Die Fusion eines Monoubiquitins an die Δ Ubi 1-5 Hüllproteinvariante war zwar in der Lage die Sekretion subviraler Partikel zu reduzieren, nicht aber einen dem Wildtyp vergleichbaren Zustand zu erzeugen. Auch Fusionen mit mutierten Ubiquitinvarianten lagen in ihrer SVP Freisetzungsrates stets deutlich über der des Wildtyps. Die Infektiositäten der Ubiquitin-Fusionsproteine lagen stets unter der der Δ Ubi 1-5 Mutante, besonders auffällig im Falle einer N/C-terminalen Fusionsmutante. Möglicherweise ist bei dieser Mutante aus sterischen Gründen keine Interaktion mit einem PFV Kapsid mehr möglich. Diese Befunde legen die Vermutung nahe, dass nicht nur alleine das Ubiquitin für die Internalisierung, bzw. die Rückhaltung des Proteins in der Zelle, verantwortlich ist, sondern möglicherweise auch die Position innerhalb des Leaderpeptids. Dieser Annahme folgend wurden Proteine hergestellt, die im LP einzelne Lysine an natürlichen, sowie nicht-natürlichen Positionen wieder eingeführt tragen. Für das fünfte natürliche Lysin innerhalb des LP konnte gezeigt werden, dass es aufgrund seiner Nähe zu zellulären Membranen nicht ubiquitiniert wird. Darüber hinaus erwies sich eine Region zwischen den Aminosäurepositionen 14 und 20 als besonders sensibel im Hinblick auf eine Modifikation durch Ubiquitin. Besonders auffallend hierbei erwies sich eine Mutante, die das dritte Lysin, an Position 18 (K18) wieder eingeführt trug. Ein Ubiquitin an dieser Position bewirkte, ähnlich wie bei der Δ N8 Glykosylierungsmutante, einen kompletten Verlust der Env-Prozessierung, sowie eine nicht mehr nachweisbare Freisetzung von subviralen und viralen Partikeln. Diese Mutante erwies sich auch als nicht mehr infektiös.

Der Prozessierungsdefekt der Δ N8, sowie der Δ Ubi 1-5 K18 Mutante resultierte in einem Transportdefekt, wodurch diese Proteine nicht mehr auf der Oberfläche transfizierter Zellen nachweisbar waren. Dieser Transportdefekt konnte jedoch in Aufnahmen eines konfokalen Mikroskops nicht eindeutig belegt werden. Für alle Hüllproteinvarianten war zwar eine Kolokalisation mit sowohl dem ER, als auch dem Golgi-Apparat nachweisbar, mit endosomalen Markern jedoch waren die Unterschiede nur marginal. Alleine für die Δ Ubi 1-5 Mutante konnte entsprechend der hohen SVP Freisetzungsrates eine deutlich geringere Kolokalisation mit Endosomen nachgewiesen werden, wohingegen die K18 Mutante stark mit späten Endosomen zu kolokalisieren scheint. Dies macht einen lysosomalen Abbau dieser Mutante wahrscheinlich, was auch die fehlende Oberflächenexpression erklären könnte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verdeutlichen den Einfluß posttranslationaler Modifikationen des PFV Env Proteins auf dessen biologischen Funktionen durch N-Glykosylierungen und Ubiquitinierungen. Während *in vitro* die Glykosylierungen scheinbar in erster Linie für eine korrekte Faltung und Prozessierung essentiell sind, erweist sich Ubiquitin als regulatorisches Signal für die intrazelluläre Verteilung und die Rückhaltung des Proteins innerhalb der Zelle, am Ort der Partikelknospung. Dies wird besonders deutlich durch die massive SVP Freisetzung der Δ Ubi 1-5 Mutante. Dennoch sind die phänotypischen Befunde in ihrer Ausprägung und Auswirkung nicht gänzlich voneinander zu trennen, was die biologische Komplexität dieser Vorgänge noch unterstreicht.

6 Literatur

- Achong, B. G., P. W. Mansell, et al. (1971). "An unusual virus in cultures from a human nasopharyngeal carcinoma." J. Natl. Cancer Inst. **46**(2): 299-307.
- Alberts, B. (2004). "Molekularbiologie der Zelle." Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Ali, M., G. P. Taylor, et al. (1996). "No evidence of antibody to human foamy virus in widespread human populations." AIDS Res. Hum. Retroviruses **12**(15): 1473-83.
- Allison, S. L., K. Stadler, et al. (1995). "Synthesis and secretion of recombinant tick-borne encephalitis virus protein E in soluble and particulate form." J. Virol. **69**(9): 5816-20.
- Aloia, R. C., H. Tian, et al. (1993). "Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **90**(11): 5181-5.
- Aviel, S., G. Winberg, et al. (2000). "Degradation of the epstein-barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) by the ubiquitin-proteasome pathway. Targeting via ubiquitination of the N-terminal residue." J. Biol. Chem. **275**(31): 23491-9.
- Bache, K. G., C. Raiborg, et al. (2003). "STAM and Hrs are subunits of a multivalent ubiquitin-binding complex on early endosomes." J. Biol. Chem. **278**(14): 12513-21.
- Back, N. K., L. Smit, et al. (1994). "An N-glycan within the human immunodeficiency virus type 1 gp120 V3 loop affects virus neutralization." Virology **199**(2): 431-8.
- Bader, J. P. (1965). "The Requirement for DNA Synthesis in the Growth of Rous Sarcoma and Rous-Associated Viruses." Virology **26**: 253-61.
- Baldwin, D. N. and M. L. Linial (1998). "The roles of Pol and Env in the assembly pathway of human foamy virus." J. Virol. **72**(5): 3658-65.
- Baldwin, D. N. and M. L. Linial (1999). "Proteolytic activity, the carboxy terminus of Gag, and the primer binding site are not required for Pol incorporation into foamy virus particles." J. Virol. **73**(8): 6387-93.
- Baltimore, D. (1992). "Viral RNA-dependent DNA polymerase. 1970." Biotechnology **24**: 3-5.
- Bansal, A., K. L. Shaw, et al. (2000). "Characterization of the R572T point mutant of a putative cleavage site in human foamy virus Env." J. Virol. **74**(6): 2949-54.
- Barbero, P., L. Bittova, et al. (2002). „Visualization of Rab9-mediated vesicle transport from endosomes to the trans-Golgi in living cells.“ J. Cell. Biol. **156**: 511-518
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, et al. (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." Science **220**(4599): 868-71.
- Barriere, H., C. Nemes, et al. (2006). "Molecular basis of oligoubiquitin-dependent internalization of membrane proteins in Mammalian cells." Traffic **7**(3): 282-97.
- Bause, E. (1983). "Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes." Biochem. J. **209**(2): 331-6.
- Beal, R., Q. Deveraux, et al. (1996). "Surface hydrophobic residues of multiubiquitin chains essential for proteolytic targeting." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **93**(2): 861-6.
- Benko, D. M., S. Schwartz, et al. (1990). "A novel human immunodeficiency virus type 1 protein, tev, shares sequences with tat, env, and rev proteins." J. Virol. **64**(6): 2505-18.

- Berg, A., T. Pietschmann, et al. (2003). "Determinants of foamy virus envelope glycoprotein mediated resistance to superinfection." Virology **314**(1): 243-52.
- Berkowitz, R., J. Fisher, et al. (1996). "RNA packaging." Curr. Top. Microbiol. Immunol. **214**: 177-218.
- Bieber, T., W. Meissner, et al. (2002). "Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine-DNA complexes." J. Control. Release **82**(2-3): 441-54.
- Bieniasz, P. D., R. A. Weiss, et al. (1995). "Cell cycle dependence of foamy retrovirus infection." J. Virol. **69**(11): 7295-9.
- Billeter, M. A., J. T. Parsons, et al. (1974). "The nucleotide sequence complexity of avian tumor virus RNA." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **71**(9): 3560-4.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res. **7**(6): 1513-23.
- Blair, W. S., H. Bogerd, et al. (1994). "Genetic analysis indicates that the human foamy virus Bel-1 protein contains a transcription activation domain of the acidic class." J. Virol. **68**(6): 3803-8.
- Block, T. M., X. Lu, et al. (1994). "Secretion of human hepatitis B virus is inhibited by the imino sugar N-butyldeoxynojirimycin." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **91**(6): 2235-9.
- Bock, M., M. Heinkelein, et al. (1998). "Cells expressing the human foamy virus (HFV) accessory Bet protein are resistant to productive HFV superinfection." Virology **250**(1): 194-204.
- Bodem, J., M. Lochelt, et al. (1997). "Regulation of gene expression by human foamy virus and potentials of foamy viral vectors." Stem Cells **15 Suppl 1**: 141-7.
- Boeke, J. D. and V. G. Corces (1989). "Transcription and reverse transcription of retrotransposons." Annu. Rev. Microbiol. **43**: 403-34.
- Bolmstedt, A., S. Olofsson, et al. (1992). "Carbohydrate determinant NeuAc-Gal beta (1-4) of N-linked glycans modulates the antigenic activity of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120." J. Gen. Virol. **73 (Pt 12)**: 3099-105.
- Bonifacino, J. S. (2004). "The GGA proteins: adaptors on the move." Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. **5**(1): 23-32.
- Bonifacino, J. S. and A. M. Weissman (1998). "Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways." Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. **14**: 19-57.
- Borden, K. L. and P. S. Freemont (1996). "The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family." Curr. Opin. Struct. Biol. **6**(3): 395-401.
- Bresnahan, P. A., W. Yonemoto, et al. (1998). "A dileucine motif in HIV-1 Nef acts as an internalization signal for CD4 downregulation and binds the AP-1 clathrin adaptor." Curr. Biol. **8**(22): 1235-8.
- Brett, T. J., L. M. Traub, et al. (2002). "Accessory protein recruitment motifs in clathrin-mediated endocytosis." Structure **10**(6): 797-809.
- Brewer, J. W. and R. B. Corley (1996). "Quality control in protein biogenesis: thiol-mediated retention monitors the redox state of proteins in the endoplasmic reticulum." J. Cell. Sci. **109 (Pt 9)**: 2383-92.
- Brown, D. W. (1997). "Threat to Humans from Virus Infections of Non-human Primates." Rev. Med. Virol. **7**(4): 239-246.

- Bruss, V. and D. Ganem (1991). "Mutational analysis of hepatitis B surface antigen particle assembly and secretion." J. Virol. **65**(7): 3813-20.
- Bultmann, A., J. Eberle, et al. (2000). "Ubiquitination of the human immunodeficiency virus type 1 env glycoprotein." J. Virol. **74**(11): 5373-6.
- Campbell, M., L. Renshaw-Gegg, et al. (1994). "Characterization of the internal promoter of simian foamy viruses." J. Virol. **68**(8): 4811-20.
- Cartellieri, M., W. Rudolph, et al. (2005). "Determination of the relative amounts of Gag and Pol proteins in foamy virus particles." Retrovirology **2**: 44.
- Chan, D. C., C. T. Chutkowski, et al. (1998). "Evidence that a prominent cavity in the coiled coil of HIV type 1 gp41 is an attractive drug target." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **95**(26): 15613-7.
- Chau, V., J. W. Tobias, et al. (1989). "A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein." Science **243**(4898): 1576-83.
- Chen, M. and D. Gerlier (2006). "Viral hijacking of cellular ubiquitination pathways as an anti-innate immunity strategy." Viral. Immunol. **19**(3): 349-62.
- Chen, W. and A. Helenius (2000). "Role of ribosome and translocon complex during folding of influenza hemagglutinin in the endoplasmic reticulum of living cells." Mol. Biol. Cell. **11**(2): 765-72.
- Chen, W., J. Helenius, et al. (1995). "Cotranslational folding and calnexin binding during glycoprotein synthesis." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **92**(14): 6229-33.
- Chiu, W. L., P. Szajner, et al. (2005). "Effects of a temperature sensitivity mutation in the J1R protein component of a complex required for vaccinia virus assembly." J. Virol. **79**(13): 8046-56.
- Ciechanover, A. and R. Ben-Saadon (2004). "N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in." Trends Cell. Biol. **14**(3): 103-6.
- Ciechanover, A., K. Breitschopf, et al. (1999). "Degradation of MyoD by the ubiquitin pathway: regulation by specific DNA-binding and identification of a novel site for ubiquitination." Mol. Biol. Rep. **26**(1-2): 59-64.
- Coffin, J., A. Haase, et al. (1986). "Human immunodeficiency viruses." Science **232**(4751): 697.
- Coffin, J. M., Hughes, S.H. and Varmus, E.V. (Eds.) (1997). "Retroviruses." Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Cole, N. L. (1992). "Temperature sensitivity of herpes simplex virus type 1 is a tissue-dependent phenomenon." Arch. Virol. **127**(1-4): 49-63.
- Cosson, P. and F. Letourneur (1994). "Coatomer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs." Science **263**(5153): 1629-31.
- Craig, H. M., M. W. Pandori, et al. (1998). "Interaction of HIV-1 Nef with the cellular dileucine-based sorting pathway is required for CD4 down-regulation and optimal viral infectivity." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **95**(19): 11229-34.
- Cristofari, G., D. Ficheux, et al. (2000). "The GAG-like protein of the yeast Ty1 retrotransposon contains a nucleic acid chaperone domain analogous to retroviral nucleocapsid proteins." J. Biol. Chem. **275**(25): 19210-7.

- Dacheux, L., A. Moreau, et al. (2004). "Evolutionary dynamics of the glycan shield of the human immunodeficiency virus envelope during natural infection and implications for exposure of the 2G12 epitope." J. Virol. **78**(22): 12625-37.
- Dash, B., A. McIntosh, et al. (1994). "Deletion of a single N-linked glycosylation site from the transmembrane envelope protein of human immunodeficiency virus type 1 stops cleavage and transport of gp160 preventing env-mediated fusion." J. Gen. Virol. **75** (Pt 6): 1389-97.
- Davis, N. L. and R. R. Rueckert (1972). "Properties of a ribonucleoprotein particle isolated from Nonidet P-40-treated Rous sarcoma virus." J. Virol. **10**(5): 1010-20.
- Delebecque, F., R. Suspene, et al. (2006). "Restriction of Foamy Viruses by APOBEC Cytidine Deaminases." J. Virol. **80**(2): 605-14.
- Delelis, O., A. Saib, et al. (2003). "Biphasic DNA synthesis in spumaviruses." J. Virol. **77**(14): 8141-6.
- Delwart, E. L. and A. T. Panganiban (1989). "Role of reticuloendotheliosis virus envelope glycoprotein in superinfection interference." J. Virol. **63**(1): 273-80.
- Deng, L., C. Wang, et al. (2000). "Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain." Cell **103**(2): 351-61.
- Di Fiore, P. P., S. Polo, et al. (2003). "When ubiquitin meets ubiquitin receptors: a signalling connection." Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **4**(6): 491-7.
- Dimitrov, D. S. (2004). "Virus entry: molecular mechanisms and biomedical applications." Nat. Rev. Microbiol. **2**(2): 109-22.
- Doms, R. W., R. A. Lamb, et al. (1993). "Folding and assembly of viral membrane proteins." Virology **193**(2): 545-62.
- DuBridge, R. B., P. Tang, et al. (1987). "Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system." Mol. Cell. Biol. **7**(1): 379-87.
- Duda, A., D. Luftenegger, et al. (2006). "Characterization of the prototype foamy virus envelope glycoprotein receptor-binding domain." J. Virol. **80**(16): 8158-67.
- Duda, A., A. Stange, et al. (2004). "Prototype foamy virus envelope glycoprotein leader peptide processing is mediated by a furin-like cellular protease, but cleavage is not essential for viral infectivity." J. Virol. **78**(24): 13865-70.
- Dupre, S. and R. Haguenauer-Tsapis (2001). "Deubiquitination step in the endocytic pathway of yeast plasma membrane proteins: crucial role of Doa4p ubiquitin isopeptidase." Mol. Cell Biol. **21**(14): 4482-94.
- Eastman, S. W. and M. L. Linial (2001). "Identification of a conserved residue of foamy virus Gag required for intracellular capsid assembly." J. Virol. **75**(15): 6857-64.
- Ellermann, M. u. B., O. (1908). "Experimentelle Leukämie bei Hühnern." Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig. **46**: 595-609.
- Enders, J. F. and T. C. Peebles (1954). "Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles." Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **86**(2): 277-86.
- Enssle, J., N. Fischer, et al. (1997). "Carboxy-terminal cleavage of the human foamy virus Gag precursor molecule is an essential step in the viral life cycle." J. Virol. **71**(10): 7312-7.

- Enssle, J., I. Jordan, et al. (1996). "Foamy virus reverse transcriptase is expressed independently from the Gag protein." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **93**(9): 4137-41.
- Enssle, J., A. Moebes, et al. (1999). "An active foamy virus integrase is required for virus replication." J. Gen. Virol. **80 (Pt 6)**: 1445-52.
- Epand, R. M. and R. F. Epand (2001). "Factors contributing to the fusogenic potency of foamy virus." Biochem. Biophys. Res. Commun. **284**(4): 870-4.
- Erlwein, O., D. Cain, et al. (1997). "Identification of sites that act together to direct dimerization of human foamy virus RNA in vitro." Virology **229**(1): 251-8.
- Erlwein, O. and A. Rethwilm (1993). "BEL-1 transactivator responsive sequences in the long terminal repeat of human foamy virus." Virology **196**(1): 256-68.
- Fang, S. and A. M. Weissman (2004). "A field guide to ubiquitylation." Cell. Mol. Life Sci. **61**(13): 1546-61.
- Fauquet, C. M., M. A. Mayo, et al. (2005). "Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses." Academic Press, San Diego.
- Feldmann, H., S. T. Nichol, et al. (1994). "Characterization of filoviruses based on differences in structure and antigenicity of the virion glycoprotein." Virology **199**(2): 469-73.
- Felkner, R. H. and M. J. Roth (1992). "Mutational analysis of the N-linked glycosylation sites of the SU envelope protein of Moloney murine leukemia virus." J. Virol. **66**(7): 4258-64.
- Feng, Y., B. Press, et al. (1995). "Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic." J. Cell Biol. **131**(6 Pt 1): 1435-52.
- Fenouillet, E., J. C. Gluckman, et al. (1994). "Functions of HIV envelope glycans." Trends. Biochem. Sci. **19**(2): 65-70.
- Fenouillet, E. and I. M. Jones (1995). "The glycosylation of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein (gp41) is important for the efficient intracellular transport of the envelope precursor gp160." J. Gen. Virol. **76 (Pt 6)**: 1509-14.
- Feuer, G. and I. S. Chen (1992). "Mechanisms of human T-cell leukemia virus-induced leukemogenesis." Biochem. Biophys. Acta. **1114**(2-3): 223-33.
- Finley, D., B. Bartel, et al. (1989). "The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis." Nature **338**(6214): 394-401.
- Fischer, N., M. Heinkelein, et al. (1998). "Foamy virus particle formation." J. Virol. **72**(2): 1610-5.
- Flugel, R. M. and K. I. Pfrepper (2003). "Proteolytic processing of foamy virus Gag and Pol proteins." Curr. Top. Microbiol. Immunol. **277**: 63-88.
- Freed, E. O. (1998). "HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle." Virology **251**(1): 1-15.
- Galan, J. M. and R. Haguenauer-Tsapis (1997). "Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein." Embo. J. **16**(19): 5847-54.
- Gallagher, P. J., J. M. Henneberry, et al. (1992). "Glycosylation requirements for intracellular transport and function of the hemagglutinin of influenza virus." J. Virol. **66**(12): 7136-45.

- Gallione, C. J. and J. K. Rose (1983). "Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding the entire glycoprotein from the New Jersey serotype of vesicular stomatitis virus." J. Virol. **46**(1): 162-9.
- Gallo, R. C., P. S. Sarin, et al. (1984). "T cell malignancies and human T cell leukemia virus." Semin. Oncol. **11**(1): 12-7.
- Ganem, D. (1996). "Hepadnaviridae and their replication. In: Fields, B.N., Knipe, D.M. and Howley, P.M. (Eds.), Virology." New York, NY: Lippincott-Raven: 2703-2737.
- Geimonen, E., I. Fernandez, et al. (2003). "Tyrosine residues direct the ubiquitination and degradation of the NY-1 hantavirus G1 cytoplasmic tail." J. Virol. **77**(20): 10760-868.
- Geiselhart, V., P. Bastone, et al. (2004). "Furin-mediated cleavage of the feline foamy virus Env leader protein." J. Virol. **78**(24): 13573-81.
- Geiselhart, V., A. Schwantes, et al. (2003). "Features of the Env leader protein and the N-terminal Gag domain of feline foamy virus important for virus morphogenesis." Virology **310**(2): 235-44.
- Gething, M. J. (1996). "Molecular chaperones: clasping the prize." Curr. Biol. **6**(12): 1573-6.
- Gilchrist, C. A., D. A. Gray, et al. (1997). "A ubiquitin-specific protease that efficiently cleaves the ubiquitin-proline bond." J. Biol. Chem. **272**(51): 32280-5.
- Giron, M. L., S. Colas, et al. (1997). "Expression and maturation of human foamy virus Gag precursor polypeptides." J. Virol. **71**(2): 1635-9.
- Giron, M. L., H. de The, et al. (1998). "An evolutionarily conserved splice generates a secreted env-Bet fusion protein during human foamy virus infection." J. Virol. **72**(6): 4906-10.
- Goepfert, P. A., K. Shaw, et al. (1999). "An endoplasmic reticulum retrieval signal partitions human foamy virus maturation to intracytoplasmic membranes." J. Virol. **73**(9): 7210-7.
- Goepfert, P. A., K. L. Shaw, et al. (1997). "A sorting motif localizes the foamy virus glycoprotein to the endoplasmic reticulum." J. Virol. **71**(1): 778-84.
- Gonda, D. K., A. Bachmair, et al. (1989). "Universality and structure of the N-end rule." J. Biol. Chem. **264**(28): 16700-12.
- Gorvel, J. P., P. Chavrier, et al. (1991). "rab5 controls early endosome fusion in vitro." Cell **64**(5): 915-25.
- Goulet, C. C., K. A. Volk, et al. (1998). "Inhibition of the epithelial Na⁺ channel by interaction of Nedd4 with a PY motif deleted in Liddle's syndrome." J. Biol. Chem. **273**(45): 30012-7.
- Grakoui, A., C. Wychowski, et al. (1993). "Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products." J. Virol. **67**(3): 1385-95.
- Gram, G. J., A. Hemming, et al. (1994). "Identification of an N-linked glycan in the V1-loop of HIV-1 gp120 influencing neutralization by anti-V3 antibodies and soluble CD4." Arch. Virol. **139**(3-4): 253-61.
- Greenberg, M. E., S. Bronson, et al. (1997). "Co-localization of HIV-1 Nef with the AP-2 adaptor protein complex correlates with Nef-induced CD4 down-regulation." Embo. J. **16**(23): 6964-76.
- Haas, A. L. and I. A. Rose (1982). "The mechanism of ubiquitin activating enzyme. A kinetic and equilibrium analysis." J. Biol. Chem. **257**(17): 10329-37.

- Haglund, K., P. P. Di Fiore, et al. (2003). "Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis." Trends Biochem. Sci. **28**(11): 598-603.
- Hahn, H., G. Baunach, et al. (1994). "Reactivity of primate sera to foamy virus Gag and Bet proteins." J. Gen. Virol. **75 (Pt 10)**: 2635-44.
- Hawryluk, M. J., P. A. Keyel, et al. (2006). "Epsin 1 is a polyubiquitin-selective clathrin-associated sorting protein." Traffic **7**(3): 262-81.
- He, F., W. S. Blair, et al. (1996). "The human foamy virus Bel-1 transcription factor is a sequence-specific DNA binding protein." J. Virol. **70**(6): 3902-8.
- He, F., J. D. Sun, et al. (1993). "Functional organization of the Bel-1 trans activator of human foamy virus." J. Virol. **67**(4): 1896-904.
- Heard, J. M. and O. Danos (1991). "An amino-terminal fragment of the Friend murine leukemia virus envelope glycoprotein binds the ecotropic receptor." J. Virol. **65**(8): 4026-32.
- Heinkelein, M., C. Leurs, et al. (2002). "Pregenomic RNA is required for efficient incorporation of pol polyprotein into foamy virus capsids." J. Virol. **76**(19): 10069-73.
- Heinkelein, M., M. Schmidt, et al. (1998). "Characterization of a cis-acting sequence in the Pol region required to transfer human foamy virus vectors." J. Virol. **72**(8): 6307-14.
- Helenius, A., trombetta, E.S., Hebert, D.N. and Simons, J.F. (1997). "Calnexin, calreticulin and the folding of glycoproteins." Trends Cell Biol. **7**: 193-200.
- Heneine, W., M. Schweizer, et al. (2003). "Human infection with foamy viruses." Curr. Top. Microbiol. Immunol. **277**: 181-96.
- Heneine, W., W. M. Switzer, et al. (1998). "Identification of a human population infected with simian foamy viruses." Nat. Med. **4**(4): 403-7.
- Herchenroder, O., D. Moosmayer, et al. (1999). "Specific binding of recombinant foamy virus envelope protein to host cells correlates with susceptibility to infection." Virology **255**(2): 228-36.
- Herchenroder, O., R. Renne, et al. (1994). "Isolation, cloning, and sequencing of simian foamy viruses from chimpanzees (SFVcpz): high homology to human foamy virus (HFV)." Virology **201**(2): 187-99.
- Herchenroder, O., R. Turek, et al. (1995). "Infectious proviral clones of chimpanzee foamy virus (SFVcpz) generated by long PCR reveal close functional relatedness to human foamy virus." Virology **214**(2): 685-9.
- Hershko, A. and A. Ciechanover (1998). "The ubiquitin system." Annu. Rev. Biochem. **67**: 425-79.
- Hershko, A., H. Heller, et al. (1983). "Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown." J. Biol. Chem. **258**(13): 8206-14.
- Hicke, L. (2001). "Protein regulation by monoubiquitin." Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. **2**(3): 195-201.
- Hill, C. L., P. D. Bieniasz, et al. (1999). "Properties of human foamy virus relevant to its development as a vector for gene therapy." J. Gen. Virol. **80 (Pt 8)**: 2003-9.
- Ho, D. D., T. R. Rota, et al. (1986). "Infection of monocyte/macrophages by human T lymphotropic virus type III." J. Clin. Invest. **77**(5): 1712-5.

- Hochstrasser, M. (1996). "Ubiquitin-dependent protein degradation." Annu. Rev. Genet. **30**: 405-39.
- Hoegel, C., B. Pfander, et al. (2002). "RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO." Nature **419**(6903): 135-41.
- Hofmann, K. and L. Falquet (2001). "A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems." Trends Biochem. Sci. **26**(6): 347-50.
- Hu, A., T. Cathomen, et al. (1995). "Influence of N-linked oligosaccharide chains on the processing, cell surface expression and function of the measles virus fusion protein." J. Gen. Virol. **76** (Pt 3): 705-10.
- Huibregtse, J. M., M. Scheffner, et al. (1995). "A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **92**(7): 2563-7.
- Huibregtse, J. M., M. Scheffner, et al. (1993). "Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins." Mol. Cell. Biol. **13**(8): 4918-27.
- Hunter, E. (1997). "Viral entry and receptors. In: Coffin, J.M., Hughes, S.H. and Varmus, E.V. (Eds.), Retroviruses." Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York: 71-120.
- Hurtley, S. M. and A. Helenius (1989). "Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum." Annu. Rev. Cell. Biol. **5**: 277-307.
- Imrich, H., M. Heinkelein, et al. (2000). "Primate foamy virus Pol proteins are imported into the nucleus." J. Gen. Virol. **81**(Pt 12): 2941-7.
- Jacks, T., H. D. Madhani, et al. (1988). "Signals for ribosomal frameshifting in the Rous sarcoma virus gag-pol region." Cell **55**(3): 447-58.
- Jackson, M. R., T. Nilsson, et al. (1990). "Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum." Embo J. **9**(10): 3153-62.
- Jackson, M. R., T. Nilsson, et al. (1993). "Retrieval of transmembrane proteins to the endoplasmic reticulum." J. Cell Biol. **121**(2): 317-33.
- Jager, S., E. Gottwein, et al. (2007). "Ubiquitination of human immunodeficiency virus type 1 Gag is highly dependent on Gag membrane association." J. Virol. **81**(17): 9193-201.
- Jamjoom, G. A., R. B. Naso, et al. (1977). "Further characterization of intracellular precursor polyproteins of Rauscher leukemia virus." Virology **78**(1): 11-34.
- Jeffers, S. A., D. A. Sanders, et al. (2002). "Covalent modifications of the ebola virus glycoprotein." J. Virol. **76**(24): 12463-72.
- Johnson, E. S., B. Bartel, et al. (1992). "Ubiquitin as a degradation signal." Embo J. **11**(2): 497-505.
- Johnson, E. S., P. C. Ma, et al. (1995). "A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal." J. Biol. Chem. **270**(29): 17442-56.
- Jordan, I., J. Ennsle, et al. (1996). "Expression of human foamy virus reverse transcriptase involves a spliced pol mRNA." Virology **224**(1): 314-9.
- Kang, Y., W. S. Blair, et al. (1998). "Identification and functional characterization of a high-affinity Bel-1 DNA binding site located in the human foamy virus internal promoter." J. Virol. **72**(1): 504-11.

- Katzmann, D. J., G. Odorizzi, et al. (2002). "Receptor downregulation and multivesicular-body sorting." Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. **3**(12): 893-905.
- Kay, B. K., M. P. Williamson, et al. (2000). "The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains." Faseb. J. **14**(2): 231-41.
- Kayman, S. C., R. Kopelman, et al. (1991). "Mutational analysis of N-linked glycosylation sites of Friend murine leukemia virus envelope protein." J. Virol. **65**(10): 5323-32.
- Keller, A., K. M. Partin, et al. (1991). "Characterization of the transcriptional trans activator of human foamy retrovirus." J. Virol. **65**(5): 2589-94.
- Kiseleva, I. V., N. V. Larionova, et al. (2006). "Genetic stability of cold-adapted influenza viruses." Vopr. Virusol. **51**(4): 13-6.
- Kogel, D., M. Aboud, et al. (1995). "Mutational analysis of the reverse transcriptase and ribonuclease H domains of the human foamy virus." Nucleic. Acids. Res. **23**(14): 2621-5.
- Konvalinka, J., M. Lochelt, et al. (1995). "Active foamy virus proteinase is essential for virus infectivity but not for formation of a Pol polyprotein." J. Virol. **69**(11): 7264-8.
- Kopito, R. R. (1997). "ER quality control: the cytoplasmic connection." Cell **88**(4): 427-30.
- Kornfeld, R. and S. Kornfeld (1985). "Assembly of asparagine-linked oligosaccharides." Annu. Rev. Biochem. **54**: 631-64.
- Kupiec, J. J., J. Tobaly-Tapiero, et al. (1988). "Evidence for a gapped linear duplex DNA intermediate in the replicative cycle of human and simian spumaviruses." Nucleic Acids Res. **16**(20): 9557-65.
- Lee, K. J., A. H. Lee, et al. (1993). "Multiple positive and negative cis-acting elements that mediate transactivation by bel1 in the long terminal repeat of human foamy virus." J. Virol. **67**(4): 2317-26.
- Lee, P. S., Y. Wang, et al. (1999). "The Cbl protooncoprotein stimulates CSF-1 receptor multiubiquitination and endocytosis, and attenuates macrophage proliferation." Embo J. **18**(13): 3616-28.
- Lehmann-Che, J., N. Renault, et al. (2007). "Centrosomal latency of incoming foamy viruses in resting cells." PLoS. Pathog. **3**(5): e74.
- Leonard, C. K., M. W. Spellman, et al. (1990). "Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells." J. Biol. Chem. **265**(18): 10373-82.
- Leurs, C., M. Jansen, et al. (2003). "Comparison of three retroviral vector systems for transduction of nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice repopulating human CD34+ cord blood cells." Hum. Gene Ther. **14**(6): 509-19.
- Lewis, P. F. and M. Emerman (1994). "Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus." J. Virol. **68**(1): 510-6.
- Li, T. T., L. N. Zhao, et al. (2005). "Regulation of apoptosis by the papillomavirus E6 oncogene." World J. Gastroenterol. **11**(7): 931-7.
- Li, Y., L. Luo, et al. (1993). "Glycosylation is necessary for the correct folding of human immunodeficiency virus gp120 in CD4 binding." J. Virol. **67**(1): 584-8.

- Li, Z., A. Pinter, et al. (1997). "The critical N-linked glycan of murine leukemia virus envelope protein promotes both folding of the C-terminal domains of the precursor polyprotein and stability of the postcleavage envelope complex." J. Virol. **71**(9): 7012-9.
- Lindemann, D. and P. A. Goepfert (2003). "The foamy virus envelope glycoproteins." Curr. Top. Microbiol. Immunol. **277**: 111-29.
- Lindemann, D., Heinkelein, M. and Rethwilm, A. (2000). "Aspects of foamy virus vectors: Host range and replication-competent vectors. In: Viral Vectors: Basic Science and gene therapy." Eaton Publishing: 515-522.
- Lindemann, D., T. Pietschmann, et al. (2001). "A particle-associated glycoprotein signal peptide essential for virus maturation and infectivity." J. Virol. **75**(13): 5762-71.
- Lindemann, D. and A. Rethwilm (1998). "Characterization of a human foamy virus 170-kilodalton Env-Bet fusion protein generated by alternative splicing." J. Virol. **72**(5): 4088-94.
- Linial, M. (2000). "Why aren't foamy viruses pathogenic?" Trends Microbiol. **8**(6): 284-9.
- Linial, M. L. (1999). "Foamy viruses are unconventional retroviruses." J. Virol. **73**(3): 1747-55.
- Liu, B., P. T. Sarkis, et al. (2005). "Regulation of Apobec3F and human immunodeficiency virus type 1 Vif by Vif-Cul5-ElonB/C E3 ubiquitin ligase." J. Virol. **79**(15): 9579-87.
- Lochelt, M. (2003). "Foamy virus transactivation and gene expression." Curr. Top. Microbiol. Immunol. **277**: 27-61.
- Lochelt, M., R. M. Flugel, et al. (1994). "The human foamy virus internal promoter directs the expression of the functional Bel 1 transactivator and Bet protein early after infection." J. Virol. **68**(2): 638-45.
- Lochelt, M., W. Muranyi, et al. (1993). "Human foamy virus genome possesses an internal, Bel-1-dependent and functional promoter." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **90**(15): 7317-21.
- Lochelt, M., F. Romen, et al. (2005). "The antiretroviral activity of APOBEC3 is inhibited by the foamy virus accessory Bet protein." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **102**(22): 7982-7.
- Lochelt, M., S. F. Yu, et al. (1995). "The human foamy virus internal promoter is required for efficient gene expression and infectivity." Virology **206**(1): 601-10.
- Lodish, H. (1996). "Molekulare Zellbiologie." Walter de Gruyter & Co, Berlin.
- Loeb, D. D. a. G., D. (1993). "Reverse transcription pathway of the hepatitis B virus. In: Skalka, A.M. and Goff, S.P. (Eds.), Reverse transcriptase." Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York: 329-355.
- Loh, P. C. (1993). Spumavirinae. The Retroviridae. J. A. Levy. New York, Plenum Press. **2**: 361-397.
- Losko, S., F. Kopp, et al. (2001). "Uptake of the ATP-binding cassette (ABC) transporter Ste6 into the yeast vacuole is blocked in the doa4 Mutant." Mol. Biol. Cell **12**(4): 1047-59.
- Lu, X., A. Mehta, et al. (1995). "Evidence that N-linked glycosylation is necessary for hepatitis B virus secretion." Virology **213**(2): 660-5.
- Lucero, P., E. Penalver, et al. (2000). "Monoubiquitination is sufficient to signal internalization of the maltose transporter in *Saccharomyces cerevisiae*." J. Bacteriol. **182**(1): 241-3.
- Luftenegger, D., M. Picard-Maureau, et al. (2005). "Analysis and function of prototype foamy virus envelope N glycosylation." J. Virol. **79**(12): 7664-72.

- Madshus, I. H. (2006). "Ubiquitin binding in endocytosis--how tight should it be and where does it happen?" Traffic **7**(3): 258-61.
- Maeda, J., A. Maeda, et al. (1999). "Release of coronavirus E protein in membrane vesicles from virus-infected cells and E protein-expressing cells." Virology **263**(2): 265-72.
- Malmquist, W. A., M. J. Van der Maaten, et al. (1969). "Isolation, immunodiffusion, immunofluorescence, and electron microscopy of a syncytial virus of lymphosarcomatous and apparently normal cattle." Cancer Res. **29**(1): 188-200.
- Mannigel, I., A. Stange, et al. (2007). "Correct capsid assembly mediated by a conserved YXXLGL motif in prototype foamy virus Gag is essential for infectivity and reverse transcription of the viral genome." J. Virol. **81**(7): 3317-26.
- Martoglio, B. and B. Dobberstein (1998). "Signal sequences: more than just greasy peptides." Trends Cell Biol. **8**(10): 410-5.
- Mathieu, M. E., P. R. Grigera, et al. (1996). "Folding, unfolding, and refolding of the vesicular stomatitis virus glycoprotein." Biochemistry **35**(13): 4084-93.
- McClure, M. O. a. E., O. (1995). "Foamy viruses - pathogenic or therapeutic potential?" Rev. Med. Virol. **5**: 229-237.
- McKissick, G. E. and P. H. Lamont (1970). "Characteristics of a virus isolated from a feline fibrosarcoma." J. Virol. **5**(2): 247-57.
- Meiering, C. D., K. E. Comstock, et al. (2000). "Multiple integrations of human foamy virus in persistently infected human erythroleukemia cells." J. Virol. **74**(4): 1718-26.
- Meiering, C. D. and M. L. Linial (2001). "Historical perspective of foamy virus epidemiology and infection." Clin. Microbiol. Rev. **14**(1): 165-76.
- Mergia, A. and M. Heinkelstein (2003). "Foamy virus vectors." Curr. Top. Microbiol. Immunol. **277**: 131-59.
- Meunier, J. C., A. Fournillier, et al. (1999). "Analysis of the glycosylation sites of hepatitis C virus (HCV) glycoprotein E1 and the influence of E1 glycans on the formation of the HCV glycoprotein complex." J. Gen. Virol. **80** (Pt 4): 887-96.
- Modrow, S., Falke, D. and Truyen, U. (2003). "Molekulare Virologie." Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Moebes, A., J. Enssle, et al. (1997). "Human foamy virus reverse transcription that occurs late in the viral replication cycle." J. Virol. **71**(10): 7305-11.
- Molinari, M. and A. Helenius (2000). "Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum." Science **288**(5464): 331-3.
- Morozov, V. A., T. D. Copeland, et al. (1997). "Protein composition and morphology of human foamy virus intracellular cores and extracellular particles." Virology **228**(2): 307-17.
- Mosesson, Y., K. Shtiegman, et al. (2003). "Endocytosis of receptor tyrosine kinases is driven by monoubiquitylation, not polyubiquitylation." J. Biol. Chem. **278**(24): 21323-6.
- Munro, S. and H. R. Pelham (1987). "A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins." Cell **48**(5): 899-907.
- Muranyi, W. and R. M. Flugel (1991). "Analysis of splicing patterns of human spumaretrovirus by polymerase chain reaction reveals complex RNA structures." J. Virol. **65**(2): 727-35.

- Nakatsu, F., M. Sakuma, et al. (2000). "A Di-leucine signal in the ubiquitin moiety. Possible involvement in ubiquitination-mediated endocytosis." J. Biol. Chem. **275**(34): 26213-9.
- Nara, P. L., R. R. Garrity, et al. (1991). "Neutralization of HIV-1: a paradox of humoral proportions." Faseb. J. **5**(10): 2437-55.
- Nassal, M. (1992). "The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly." J. Virol. **66**(7): 4107-16.
- Nassal, M. and H. Schaller (1993). "Hepatitis B virus replication." Trends Microbiol. **1**(6): 221-8.
- Nauseef, W. M. (1999). "Quality control in the endoplasmic reticulum: lessons from hereditary myeloperoxidase deficiency." J. Lab. Clin. Med. **134**(3): 215-21.
- Nestler, U., M. Heinkelein, et al. (1997). "Foamy virus vectors for suicide gene therapy." Gene. Ther. **4**(11): 1270-7.
- Netzer, K. O., A. Rethwilm, et al. (1990). "Identification of the major immunogenic structural proteins of human foamy virus." J. Gen. Virol. **71** (Pt 5): 1237-41.
- Nilsson, I. and G. von Heijne (2000). "Glycosylation efficiency of Asn-Xaa-Thr sequons depends both on the distance from the C terminus and on the presence of a downstream transmembrane segment." J. Biol. Chem. **275**(23): 17338-43.
- Nilsson, I. M. and G. von Heijne (1993). "Determination of the distance between the oligosaccharyltransferase active site and the endoplasmic reticulum membrane." J. Biol. Chem. **268**(8): 5798-801.
- Nowrouzi, A., M. Dittrich, et al. (2006). "Genome-wide mapping of foamy virus vector integrations into a human cell line." J. Gen. Virol. **87**(Pt 5): 1339-47.
- Ohgimoto, S., T. Shioda, et al. (1998). "Location-specific, unequal contribution of the N glycans in simian immunodeficiency virus gp120 to viral infectivity and removal of multiple glycans without disturbing infectivity." J. Virol. **72**(10): 8365-70.
- Oliver, J. D., H. L. Roderick, et al. (1999). "ERp57 functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins calreticulin and calnexin." Mol. Biol. Cell. **10**(8): 2573-82.
- Parkin, N. T., M. Chamorro, et al. (1992). "Human immunodeficiency virus type 1 gag-pol frameshifting is dependent on downstream mRNA secondary structure: demonstration by expression in vivo." J. Virol. **66**(8): 5147-51.
- Parodi, A. J., D. H. Mendelzon, et al. (1983). "Transient glucosylation of protein-bound Man9GlcNAc2, Man8GlcNAc2, and Man7GlcNAc2 in calf thyroid cells. A possible recognition signal in the processing of glycoproteins." J. Biol. Chem. **258**(13): 8260-5.
- Patnaik, A., V. Chau, et al. (2000). "Ubiquitin is part of the retrovirus budding machinery." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **97**(24): 13069-74.
- Patton, G. S., O. Erlwein, et al. (2004). "Cell-cycle dependence of foamy virus vectors." J. Gen. Virol. **85**(Pt 10): 2925-30.
- Patzer, E. J., G. R. Nakamura, et al. (1984). "Intracellular transport and secretion of hepatitis B surface antigen in mammalian cells." J. Virol. **51**(2): 346-53.
- Peters, K., T. Wiktorowicz, et al. (2005). "RNA and protein requirements for incorporation of the Pol protein into foamy virus particles." J. Virol. **79**(11): 7005-13.

- Petit, C., M. L. Giron, et al. (2003). "Targeting of incoming retroviral Gag to the centrosome involves a direct interaction with the dynein light chain 8." J. Cell. Sci. **116**(Pt 16): 3433-42.
- Pfrepper, K. I., M. Lochelt, et al. (1999). "Molecular characterization of proteolytic processing of the Gag proteins of human spumavirus." J. Virol. **73**(9): 7907-11.
- Pfrepper, K. I., H. R. Rackwitz, et al. (1998). "Molecular characterization of proteolytic processing of the Pol proteins of human foamy virus reveals novel features of the viral protease." J. Virol. **72**(9): 7648-52.
- Phung, H. T., Y. Tohya, et al. (2005). "Characterization of Env antigenicity of feline foamy virus (FeFV) using FeFV-infected cat sera and a monoclonal antibody." Vet. Microbiol. **106**(3-4): 201-7.
- Picard-Maureau, M., G. Jarmy, et al. (2003). "Foamy virus envelope glycoprotein-mediated entry involves a pH-dependent fusion process." J. Virol. **77**(8): 4722-30.
- Pickart, C. M. (2001). "Mechanisms underlying ubiquitination." Annu. Rev. Biochem. **70**: 503-33.
- Pickart, C. M. (2002). "DNA repair: right on target with ubiquitin." Nature **419**(6903): 120-1.
- Pietschmann, T., M. Heinkelein, et al. (1999). "Foamy virus capsids require the cognate envelope protein for particle export." J. Virol. **73**(4): 2613-21.
- Pietschmann, T., H. Zentgraf, et al. (2000). "An evolutionarily conserved positively charged amino acid in the putative membrane-spanning domain of the foamy virus envelope protein controls fusion activity." J. Virol. **74**(10): 4474-82.
- Pincus, T. (1980). "Late-passage SC-1 cells resistant to N- and B-tropic viruses but sensitive to NB-tropic viruses." J. Virol. **34**(3): 711-5.
- Pinter, A. (1989). "Functions of murine leukemia virus envelope products in leukemogenesis. In: Hanafuse, H., Pinter, A. and Pullman, M. (Eds.), *Retroviruses and disease*." Academic Press, Inc., San Diego, Calif.
- Plant, P. J., F. Lafont, et al. (2000). "Apical membrane targeting of Nedd4 is mediated by an association of its C2 domain with annexin XIIIb." J. Cell Biol. **149**(7): 1473-84.
- Poiesz, B. J., F. W. Ruscetti, et al. (1980). "T-cell lines established from human T-lymphocytic neoplasias by direct response to T-cell growth factor." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **77**(11): 6815-9.
- Pollakis, G., S. Kang, et al. (2001). "N-linked glycosylation of the HIV type-1 gp120 envelope glycoprotein as a major determinant of CCR5 and CXCR4 coreceptor utilization." J. Biol. Chem. **276**(16): 13433-41.
- Polonoff, E., C. A. Machida, et al. (1982). "Glycosylation and intracellular transport of membrane glycoproteins encoded by murine leukemia viruses. Inhibition by amino acid analogues and by tunicamycin." J. Biol. Chem. **257**(23): 14023-8.
- Polzer, S., M. T. Dittmar, et al. (2001). "Loss of N-linked glycans in the V3-loop region of gp120 is correlated to an enhanced infectivity of HIV-1." Glycobiology **11**(1): 11-9.
- Pryor, M. J., R. C. Gualano, et al. (1998). "Growth restriction of dengue virus type 2 by site-specific mutagenesis of virus-encoded glycoproteins." J. Gen. Virol. **79** (Pt 11): 2631-9.
- Quigley, J. P., D. B. Rifkin, et al. (1971). "Phospholipid composition of Rous sarcoma virus, host cell membranes and other enveloped RNA viruses." Virology **46**(1): 106-16.

- Quinones-Kochs, M. I., L. Buonocore, et al. (2002). "Role of N-linked glycans in a human immunodeficiency virus envelope glycoprotein: effects on protein function and the neutralizing antibody response." J. Virol. **76**(9): 4199-211.
- Raiborg, C., K. G. Bache, et al. (2002). "Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes." Nat. Cell. Biol. **4**(5): 394-8.
- Rasheed, S., W. A. Nelson-Rees, et al. (1974). "Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080)." Cancer **33**(4): 1027-33.
- Ratner, L. (1992). "Glucosidase inhibitors for treatment of HIV-1 infection." AIDS Res. Hum. Retroviruses **8**(2): 165-73.
- Rein, A., A. M. Schultz, et al. (1982). "Inhibitors of glycosylation reverse retroviral interference." Virology **119**(1): 185-92.
- Reinstein, E., M. Scheffner, et al. (2000). "Degradation of the E7 human papillomavirus oncoprotein by the ubiquitin-proteasome system: targeting via ubiquitination of the N-terminal residue." Oncogene **19**(51): 5944-50.
- Reitter, J. N. and R. C. Desrosiers (1998). "Identification of replication-competent strains of simian immunodeficiency virus lacking multiple attachment sites for N-linked carbohydrates in variable regions 1 and 2 of the surface envelope protein." J. Virol. **72**(7): 5399-407.
- Reitter, J. N., R. E. Means, et al. (1998). "A role for carbohydrates in immune evasion in AIDS." Nat. Med. **4**(6): 679-84.
- Renne, R., E. Friedl, et al. (1992). "Genomic organization and expression of simian foamy virus type 3 (SFV-3)." Virology **186**(2): 597-608.
- Rethwilm, A. (1995). "Regulation of foamy virus gene expression." Curr. Top. Microbiol. Immunol. **193**: 1-24.
- Rethwilm, A. (1996). "Unexpected replication pathways of foamy viruses." J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol. **13 Suppl 1**: S248-53.
- Rethwilm, A., O. Erlwein, et al. (1991). "The transcriptional transactivator of human foamy virus maps to the bel 1 genomic region." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **88**(3): 941-5.
- Rhee, S. S., H. X. Hui, et al. (1990). "Preassembled capsids of type D retroviruses contain a signal sufficient for targeting specifically to the plasma membrane." J. Virol. **64**(8): 3844-52.
- Richardson, C., D. Hull, et al. (1986). "The nucleotide sequence of the mRNA encoding the fusion protein of measles virus (Edmonston strain): a comparison of fusion proteins from several different paramyxoviruses." Virology **155**(2): 508-23.
- Ritter, C. and A. Helenius (2000). "Recognition of local glycoprotein misfolding by the ER folding sensor UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase." Nat. Struct. Biol. **7**(4): 278-80.
- Robzyk, K., J. Recht, et al. (2000). "Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast." Science **287**(5452): 501-4.
- Rolls, M. M., P. A. Stein, et al. (1999). "A visual screen of a GFP-fusion library identifies a new type of nuclear envelope membrane protein." J. Cell. Biol. **146**(1): 29-44.
- Rolls, M. M., P. Webster, et al. (1994). "Novel infectious particles generated by expression of the vesicular stomatitis virus glycoprotein from a self-replicating RNA." Cell **79**(3): 497-506.

- Rosenberg, N. a. J., P. (1997). "Retroviral Pathogenesis. In: Coffin, J.M., Hughes, S.H. and Varmus, E.V. (Eds.), Retroviruses." Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York: 475-586.
- Rosner, M. R., J. S. Tung, et al. (1980). "Relationship of GIX antigen expression to the glycosylation of murine leukemia virus glycoprotein." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **77**(11): 6420-4.
- Rost, M., S. Mann, et al. (2006). "Gamma-adaptin, a novel ubiquitin-interacting adaptor, and Nedd4 ubiquitin ligase control hepatitis B virus maturation." J. Biol. Chem. **281**(39): 29297-308.
- Roth, A. F. and N. G. Davis (2000). "Ubiquitination of the PEST-like endocytosis signal of the yeast a-factor receptor." J. Biol. Chem. **275**(11): 8143-53.
- Rotin, D., O. Staub, et al. (2000). "Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases." J. Membr. Biol. **176**(1): 1-17.
- Rous, P. (1911). "A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells." J. Exp. Med. **13**: 397-411.
- Rowe, W. P., J. W. Hartley, et al. (1971). "Noninfectious AKR mouse embryo cell lines in which each cell has the capacity to be activated to produce infectious murine leukemia virus." Virology **46**(3): 866-76.
- Roy, J., W. Rudolph, et al. (2003). "Feline foamy virus genome and replication strategy." J. Virol. **77**(21): 11324-31.
- Russell, D. W. and A. D. Miller (1996). "Foamy virus vectors." J. Virol. **70**(1): 217-22.
- Russell, R. A., H. L. Wiegand, et al. (2005). "Foamy virus Bet proteins function as novel inhibitors of the APOBEC3 family of innate antiretroviral defense factors." J. Virol. **79**(14): 8724-31.
- Rustigian, R., P. Johnston, et al. (1955). "Infection of monkey kidney tissue cultures with virus-like agents." Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **88**(1): 8-16.
- Saib, A., F. Puvion-Dutilleul, et al. (1997). "Nuclear targeting of incoming human foamy virus Gag proteins involves a centriolar step." J. Virol. **71**(2): 1155-61.
- Salcini, A. E., H. Chen, et al. (1999). "Epidermal growth factor pathway substrate 15, Eps15." Int. J. Biochem. Cell Biol. **31**(8): 805-9.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1992). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977." Biotechnology **24**: 104-8.
- Schagger, H. and G. von Jagow (1987). "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." Anal. Biochem. **166**(2): 368-79.
- Schliephake, A. W. and A. Rethwilm (1994). "Nuclear localization of foamy virus Gag precursor protein." J. Virol. **68**(8): 4946-54.
- Schultz, A. M. and S. Oroszlan (1979). "Tunicamycin inhibits glycosylation of precursor polyprotein encoded by env gene of Rauscher murine leukemia virus." Biochem. Biophys. Res. Commun. **86**(4): 1206-13.
- Schweizer, M., V. Falcone, et al. (1997). "Simian foamy virus isolated from an accidentally infected human individual." J. Virol. **71**(6): 4821-4.

- Schweizer, M., R. Turek, et al. (1995). "Markers of foamy virus infections in monkeys, apes, and accidentally infected humans: appropriate testing fails to confirm suspected foamy virus prevalence in humans." AIDS Res. Hum. Retroviruses **11**(1): 161-70.
- Sfakianos, J. N. and E. Hunter (2003). "M-PMV capsid transport is mediated by Env/Gag interactions at the pericentriolar recycling endosome." Traffic **4**(10): 671-80.
- Shaner, N. C., R. E. Campbell, et al. (2004). „Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discoma* sp. red fluorescent protein.“ Nat. Biotechnol. **22**(12): 1567-72.
- Shaw, K. L., D. Lindemann, et al. (2003). "Foamy virus envelope glycoprotein is sufficient for particle budding and release." J. Virol. **77**(4): 2338-48.
- Sherer, N. M., M. J. Lehmann, et al. (2003). "Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies." Traffic **4**(11): 785-801.
- Shih, S. C., K. E. Sloper-Mould, et al. (2000). "Monoubiquitin carries a novel internalization signal that is appended to activated receptors." Embo J. **19**(2): 187-98.
- Shinnick, T. M., R. A. Lerner, et al. (1981). "Nucleotide sequence of Moloney murine leukaemia virus." Nature **293**(5833): 543-8.
- Shioda, T. and H. Shibuta (1990). "Production of human immunodeficiency virus (HIV)-like particles from cells infected with recombinant vaccinia viruses carrying the gag gene of HIV." Virology **175**(1): 139-48.
- Sloper-Mould, K. E., J. C. Jemc, et al. (2001). "Distinct functional surface regions on ubiquitin." J. Biol. Chem. **276**(32): 30483-9.
- Sodora, D. L., G. H. Cohen, et al. (1989). "Influence of asparagine-linked oligosaccharides on antigenicity, processing, and cell surface expression of herpes simplex virus type 1 glycoprotein D." J. Virol. **63**(12): 5184-93.
- Sodroski, J. G., C. A. Rosen, et al. (1984). "Trans-acting transcriptional activation of the long terminal repeat of human T lymphotropic viruses in infected cells." Science **225**(4660): 381-5.
- Sommerfelt, M. A. and R. A. Weiss (1990). "Receptor interference groups of 20 retroviruses plating on human cells." Virology **176**(1): 58-69.
- Soneoka, Y., P. M. Cannon, et al. (1995). "A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors." Nucleic Acids Res. **23**(4): 628-33.
- Sonnichsen, B., S. De Renzis, et al. (2000). "Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11." J. Cell Biol. **149**(4): 901-14.
- Sousa, M. and A. J. Parodi (1995). "The molecular basis for the recognition of misfolded glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase." Embo J. **14**(17): 4196-203.
- Spence, J., S. Sadis, et al. (1995). "A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination." Mol. Cell Biol. **15**(3): 1265-73.
- Springael, J. Y., J. M. Galan, et al. (1999). "NH₄⁺-induced down-regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Gap1p permease involves its ubiquitination with lysine-63-linked chains." J. Cell Sci. **112** (Pt 9): 1375-83.

- Stanke, N., A. Stange, et al. (2005). "Ubiquitination of the Prototype Foamy Virus Envelope Glycoprotein Leader Peptide Regulates Subviral Particle Release." J. Virol. **79**(24): 15074-15083.
- Stevenson, M., C. Meier, et al. (1988). "Envelope glycoprotein of HIV induces interference and cytolysis resistance in CD4+ cells: mechanism for persistence in AIDS." Cell **53**(3): 483-96.
- Strack, B., A. Calistri, et al. (2000). "A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **97**(24): 13063-8.
- Stryer, L. (1999). "Biochemie." Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin.
- Summers, J. and W. S. Mason (1982). "Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate." Cell **29**(2): 403-15.
- Swanstrom, R. a. W., J.W. (1997). "Synthesis, assembly and processing of viral proteins. In: Coffin, J.M., Hughes, S.H. and Varmus, E.V. (Eds.), Retroviruses." Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York: 263-335.
- Switzer, W. M., V. Bhullar, et al. (2004). "Frequent simian foamy virus infection in persons occupationally exposed to nonhuman primates." J. Virol. **78**(6): 2780-9.
- Talis, A. L., J. M. Huibregtse, et al. (1998). "The role of E6AP in the regulation of p53 protein levels in human papillomavirus (HPV)-positive and HPV-negative cells." J. Biol. Chem. **273**(11): 6439-45.
- Tarentino, A. L., R. B. Trimble, et al. (1989). "Enzymatic approaches for studying the structure, synthesis, and processing of glycoproteins." Methods Cell Biol. **32**: 111-39.
- Temin, H. M. (1963). "The Effects of Actinomycin D on Growth of Rous Sarcoma Virus in Vitro." Virology **20**: 577-82.
- Temin, H. M. and S. Mizutani (1992). "RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. 1970." Biotechnology **24**: 51-6.
- Terrell, J., S. Shih, et al. (1998). "A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein-coupled receptor." Mol. Cell. **1**(2): 193-202.
- Thomas, G. (2002). "Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease." Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. **3**(10): 753-66.
- Thrower, J. S., L. Hoffman, et al. (2000). "Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal." Embo J. **19**(1): 94-102.
- Tobaly-Tapiero, J., P. Bittoun, et al. (2000). "Isolation and characterization of an equine foamy virus." J. Virol. **74**(9): 4064-73.
- Trobridge, G., N. Josephson, et al. (2002). "Improved foamy virus vectors with minimal viral sequences." Mol. Ther. **6**(3): 321-8.
- Trombetta, S. E. and A. J. Parodi (1992). "Purification to apparent homogeneity and partial characterization of rat liver UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase." J. Biol. Chem. **267**(13): 9236-40.
- Varmus, H. a. B., P. (1989). "Retroviruses. In: Howe, M. and Berg, D. (Eds.), Mobile DNA." American Society for Microbiology, Washington, D.C.: 53-108.
- Venkatesh, L. K. and G. Chinnadurai (1993). "The carboxy-terminal transcription enhancement region of the human spumaretrovirus transactivator contains discrete determinants of the activator function." J. Virol. **67**(7): 3868-76.

- Vennema, H., G. J. Godeke, et al. (1996). "Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes." Embo J. **15**(8): 2020-8.
- Verma, I. M., N. L. Meuth, et al. (1971). "Covalently linked RNA-DNA molecule as initial product of RNA tumour virus DNA polymerase." Nat. New. Biol. **233**(39): 131-4.
- Vidal, S., G. Mottet, et al. (1989). "Addition of high-mannose sugars must precede disulfide bond formation for proper folding of Sendai virus glycoproteins." J. Virol. **63**(2): 892-900.
- Vitelli, R., M. Santillo, et al. (1997). "Role of the small GTPase Rab7 in the late endocytic pathway." J. Biol. Chem. **272**(7): 4391-7.
- Voges, D., P. Zwickl, et al. (1999). "The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis." Annu. Rev. Biochem. **68**: 1015-68.
- Vogt, P. K. (1997a). "Historical introduction to the general properties of retroviruses. In: Coffin, J.M., Hughes, S.H. and Varmus, E.V. (Eds.), Retroviruses." Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York: 1-25.
- Vogt, P. K. (1997b). "Retroviral virions and genomes. In: Coffin, J.M., Hughes, S.H. and Varmus, E.V. (Eds.), Retroviruses." Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York: 27-70.
- Wang, G. and M. J. Mulligan (1999). "Comparative sequence analysis and predictions for the envelope glycoproteins of foamy viruses." J. Gen. Virol. **80**(1): 245-54.
- Weissman, A. M. (2001). "Themes and variations on ubiquitylation." Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. **2**(3): 169-78.
- Wengler, G. (1989). "Cell-associated West Nile flavivirus is covered with E+pre-M protein heterodimers which are destroyed and reorganized by proteolytic cleavage during virus release." J. Virol. **63**(6): 2521-6.
- Werness, B. A., A. J. Levine, et al. (1990). "Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53." Science **248**(4951): 76-9.
- Werr, M. and R. Prange (1998). "Role for calnexin and N-linked glycosylation in the assembly and secretion of hepatitis B virus middle envelope protein particles." J. Virol. **72**(1): 778-82.
- Wilk, T., F. de Haas, et al. (2000). "The intact retroviral Env glycoprotein of human foamy virus is a trimer." J. Virol. **74**(6): 2885-7.
- Wilk, T., V. Geiselhart, et al. (2001). "Specific interaction of a novel foamy virus Env leader protein with the N-terminal Gag domain." J. Virol. **75**(17): 7995-8007.
- Wilkinson, K. D. (2000). "Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome." Semin. Cell. Dev. Biol. **11**(3): 141-8.
- Wills, J. W. and R. C. Craven (1991). "Form, function, and use of retroviral gag proteins." Aids **5**(6): 639-54.
- Wyatt, R., N. Sullivan, et al. (1993). "Functional and immunologic characterization of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins containing deletions of the major variable regions." J. Virol. **67**(8): 4557-65.
- Yamashita, Y., K. Shimokata, et al. (1996). "Calnexin acts as a molecular chaperone during the folding of glycoprotein B of human cytomegalovirus." J. Virol. **70**(4): 2237-46.

- Yoshinaka, Y., I. Katoh, et al. (1985). "Translational readthrough of an amber termination codon during synthesis of feline leukemia virus protease." J. Virol. **55**(3): 870-3.
- Yu, S. F., D. N. Baldwin, et al. (1996). "Human foamy virus replication: a pathway distinct from that of retroviruses and hepadnaviruses." Science **271**(5255): 1579-82.
- Yu, S. F., S. W. Eastman, et al. (2006). "Foamy virus capsid assembly occurs at a pericentriolar region through a cytoplasmic targeting/retention signal in Gag." Traffic **7**(8): 966-77.
- Yu, S. F., K. Edelmann, et al. (1996). "The carboxyl terminus of the human foamy virus Gag protein contains separable nucleic acid binding and nuclear transport domains." J. Virol. **70**(12): 8255-62.
- Yu, S. F., M. D. Sullivan, et al. (1999). "Evidence that the human foamy virus genome is DNA." J. Virol. **73**(2): 1565-72.
- Yu, X., Y. Yu, et al. (2003). "Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex." Science **302**(5647): 1056-60.
- Yu, Y., S. E. Wang, et al. (2005). "The KSHV immediate-early transcription factor RTA encodes ubiquitin E3 ligase activity that targets IRF7 for proteasome-mediated degradation." Immunity **22**(1): 59-70.
- Zakian, V. A. (1995). "Telomeres: beginning to understand the end." Science **270**(5242): 1601-7.
- Zapun, A., C. A. Jakob, et al. (1999). "Protein folding in a specialized compartment: the endoplasmic reticulum." Structure **7**(8): R173-82.
- Zemba, M., A. Alke, et al. (2000). "Construction of infectious feline foamy virus genomes: cat antisera do not cross-neutralize feline foamy virus chimera with serotype-specific Env sequences." Virology **266**(1): 150-6.
- Zemba, M., T. Wilk, et al. (1998). "The carboxy-terminal p3Gag domain of the human foamy virus Gag precursor is required for efficient virus infectivity." Virology **247**(1): 7-13.
- Zerial, M. and H. McBride (2001). "Rab proteins as membrane organizers." Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. **2**(2): 107-17.
- Zhu, X., C. Borchers, et al. (2000). "Mass spectrometric characterization of the glycosylation pattern of HIV-gp120 expressed in CHO cells." Biochemistry **39**(37): 11194-204.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère	HBV	Hepatitis B Virus
A. dest.	destilliertes Wasser	HCV	Hepatitis C Virus
AIDS	engl. Aquired Immunodeficiency Syndrome	HFV	Humanes Foamy Virus
AS	Aminosäure	HIV	engl. Human Immunodeficiency Virus
ASLV	Avian Sarcoma/Leukosis Virus	HPV	Humanes Papillom Virus
BD	Budding Domäne	HSV	Herpes Simplex Virus
bel	engl. between Env & LTR	HTLV	Humanes T-Zell Leukämie Virus
°C	Grad Celsius	IN	retrovirale Integrase
CA	retrovirales Kapsidprotein	IP	interner Promotor
CAS	engl. Cis-Acting Sequence	kD	Kilodalton
Ci	Curie	KSHV	Kaposi-Sarkom assoziiertes Herpesvirus
cm	Zentimeter	I	Liter
CTRS	engl. Cytoplasmic Targeting/Retention Signal	lacZ	β-Galaktosidase
CyD	zytoplasmatische Domäne	LP	engl. Leaderpeptid
d.h.	das heißt	LTR	engl. Long Terminal Repeat
DNA	Desoxyribonukleinsäure	m-	milli-
dsDNA	doppelsträngige DNA	M	Molar
DUB	Deubiquitinierungsenzyme	MA	retrovirales Matrixprotein
E1	Ubiquitin-Aktivierungsenzym	MHR	engl. Major Homology Region
E2	Ubiquitin-Konjugationsenzym	min	Minute
E3	Ubiquitin-Protein Ligase	MLV	Maus Leukämie Virus
EBV	Epstein-Barr Virus	MMTV	engl. Mouse Mammary Tumor Virus
eGFP	engl. enhanced Green Fluorescent Protein	Mo-MuLV	Moloney-MuLV
EGFR	epidermaler Wachstums-faktor	MSD	membranspannende Domäne
EM	Elektronenmikroskop	MTOC	engl. Microtubuli Organizing Center
EndoH	Endoglykosidase H	MuLV	engl. Murine Leukemia Virus
Env	retrovirales Hüllprotein	MVB	engl. Multivesicular Bodies
ER	endoplasmatisches Reticulum	n-	nano-
ERRS	engl. ER Retrieval Signal	NC	retrovirales Nukleokapsidprotein
FACS	Durchflußzytometrie	NGS	N-Glykosylierungsstelle
FeLV	Feline Leukemia Virus	NLS	nukleäres Kernlokalisationssignal
FP	Fusionspeptid	nm	Nanometer
Fr-MuLV	Friend-MuLV	OD	optische Dichte
FV	Foamy Virus	ORF	engl. Open Reading Frame
g	Gramm		
Gag	retrovirales gruppen- spezifisches Antigen		
h	Stunde		

Anhang

ori	Replikationsursprung	SU	Oberflächenuntereinheit des
pbs	Primer Bindungsstelle		retroviralen Env Proteins
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	ssDNA	einzelsträngige DNA
PES	engl. Pol Encapsidation	SVP	subvirale Partikel
	Sequences	Tas	engl. Transactivator of
PFV	Prototyp Foamy Virus		Spumaviruses
PNGaseF	Protein:N-Glykosidase F	TGN	Trans-Golgi Netzwerk
Pol	Polymerase	TM	Transmembranuntereinheit
ppt	Polypurintrakt		des retroviralen Env Proteins
PR	Protease	u	engl. Unit
RBD	Rezeptorbindungsdomäne	UIM	engl. Ubiquitin Interacting Motif
RNA	Ribonukleinsäure	V	Volt
rpm	Umdrehungen pro Minute	VLP	engl. Virus Like Particle
RT	Reverse Transkriptase	VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
s	Sekunde	WB	Western Blot
SA	Spleiß-Akzeptor	wt	Wildtyp
SD	Spleiß-Donor	YFP	engl. Yellow Fluorescent
SIR	Superinfektionsresistenz		Protein
SIV	engl. Simian Immuno-	z.B.	zum Beispiel
	deficiency Virus	µ-	Mikro-

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur und Genomorganisation von Retroviren	10
Abbildung 2: Genom und Genexpression einfacher Retroviren	12
Abbildung 3: Retroviraler Replikationszyklus.....	14
Abbildung 4: Genomorganisation und Genexpression der Foamyviren.....	17
Abbildung 5: Der foamyvirale Replikationszyklus	20
Abbildung 6: Übersicht über funktionelle Domänen des PFV Env.....	24
Abbildung 7: Schematische Darstellung der drei Grundtypen N-glykosidisch gebundener Kohlenwasserstoffe	28
Abbildung 8: Globuläre Struktur des Ubiquitins	34
Abbildung 9: Replikationsdefizientes Vektorsystem.....	66
Abbildung 10: Biochemische Analyse der N-Glykosylierungsmutanten.....	76
Abbildung 11: Infektionsanalyse der NGS-Mutanten	77
Abbildung 12: Oberflächenexpression ausgewählter N-Glykosylierungsmutanten	79
Abbildung 13: Schematische Übersicht über die PFV Env Organisation	80
Abbildung 14: Schematische Darstellung des wildtypischen PFV Env Expressionskonstrukts pczHFVenvEM002.....	81
Abbildung 15: Biochemische Analyse der NGS-Mutanten	83
Abbildung 16: Infektionsanalyse ausgewählter NGS-Mutanten.....	85
Abbildung 17: LacZ-Titration ausgewählter NGS-Mutanten	87
Abbildung 18: Temperatursensitivitätstest ausgewählter NGS-Mutanten	88
Abbildung 19: Glykosidaseverdau von PFV Partikeln	89
Abbildung 20: Schematische Darstellung der Env/Ubi Fusionskonstrukte.....	93
Abbildung 21: Biochemische Analyse der Env/Ubi Fusionsproteine	94
Abbildung 22: Schematische Darstellung weiterer Env/Ubi Fusionskonstrukte	96
Abbildung 23: Biochemische Analyse verschiedener Env/Ubi Fusionsproteine.....	97
Abbildung 24: Quantifizierung der SVP Freisetzung der Env/Ubi Fusionsproteine	99
Abbildung 25: Virale Partikelpräparation der Env/Ubi Fusionsproteine	100
Abbildung 26: Infektionsanalyse der Env/Ubi Fusionsmutanten.....	101
Abbildung 27: Schematische Darstellung der Lysin-Mutanten	103
Abbildung 28: Biochemische Analyse der Lysin-Mutanten.....	105
Abbildung 29: Schematische Darstellung aller Lysin-Mutanten.....	106
Abbildung 30: Biochemische Analyse aller Lysin-Mutanten	108
Abbildung 31: Quantifizierung der SVP Freisetzung aller Lysin-Mutanten.....	110
Abbildung 32: Virale Partikelpräparation aller Lysin-Mutanten	111
Abbildung 33: Quantifizierung der viralen Partikelfreisetzung aller Lysin-Mutanten	112
Abbildung 34: Infektionsanalyse der Lysin-Mutanten.....	114
Abbildung 35: Oberflächenbiotinylierung ausgewählter Lysin-Mutanten.....	117
Abbildung 36: Immunofluoreszenz Env-transfizierter HT1080 Zellen	119
Abbildung 37: Zeitverlaufsexperiment zur Detektion von PFV Env	121
Abbildung 38: Immunofluoreszenz Cherry-markierter Env-Mutanten	123
Abbildung 39: Zeitverlaufsexperiment zur Detektion der Cherry-markierten PFV Hüllproteine	125

Abbildung 40: Kolokalisationsanalyse Env/ER	127
Abbildung 41: Kolokalisationsanalyse Env/Golgi	129
Abbildung 42: Kolokalisationsanalyse Env/Rab5	131
Abbildung 43: Kolokalisationsanalyse Env/Rab7	132
Abbildung 44: Kolokalisationsuntersuchung PFV Env/Gag	134

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifizierung der Familie der <i>Retrovirinae</i> (nach Rethwilm, 2003)	9
--	---

7.4 Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die Dissertation „Einfluss posttranslationaler Modifikationen auf die Funktion des Prototyp Foamy Virus Hüllproteins“ selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Teile der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse sind bereits publiziert worden in:

Lüftenegger, D., M. Picard-Maureau, Stanke, N., Rethwilm, A. and D. Lindemann. (2005). "Analysis and function of prototype foamy virus envelope N glycosylation." J. Virol. 79(12): 7664-72.

Zudem versichere ich, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Dresden, den 18. Oktober 2007

(Daniel Lüftenegger)

7.5 Lebenslauf

Geburtsdatum: 26. März 1976
Geburtsort: Erlangen
Nationalität: Deutsch
Familienstand: Ledig

Ausbildung:

1983-1986 Grundschule Niederndorf

1986-1989 Deutsche Schule Peking

1989-1996 Gymnasium Herzogenaurach, Abschluss: Abitur (Note: 2,4)

1996-1997 Zivildienst an der Ludwig-Thoma Schule Herzogenaurach

1997-2000 Grundstudium an der Universität Würzburg,

Abschluss: Vordiplom (Note: 2,0)

2000-2003 Hauptstudium an der Universität Würzburg

Abschluss: Diplom (Note: 1,2)

seit 03/2003 Dissertation am Institut für Virologie der TU Dresden
 Betreuer: Prof. Dr. G. Barth, PD Dr. D. Lindemann

7.6 Publikationen

- Lüftenecker, D.**, Picard-Maureau, M., Stanke, N., Rethwilm, A. and D. Lindemann. (2005). "Analysis and function of prototype foamy virus envelope N glycosylation." J. Virol. 79(12): 7664-72.
- Lüftenecker, D.** and D. Lindemann. (in Vorbereitung). "PFV env ubiquitination and its impact on viral and subviral particle release."
- Duda, A., Stange, A., **Lüftenecker, D.**, Stanke, N., Westphal, D., Pietschmann, T., Eastman, S. W., Linial, M. L., Rethwilm, A. and D. Lindemann. (2004). "Prototype foamy virus envelope glycoprotein leader peptide processing is mediated by a furin-like cellular protease, but cleavage is not essential for viral infectivity." J. Virol. 78(24): 13865-70.
- Stanke, N., Stange, A., **Lüftenecker, D.**, Zentgraf, H. and D. Lindemann. (2005). "Ubiquitination of the Prototype Foamy Virus Envelope Glycoprotein Leader Peptide Regulates Subviral Particle Release." J. Virol. 79(24): 15074-15083.
- Duda, A., **Lüftenecker, D.**, Pietschmann, T. and D. Lindemann. (2006). " Characterization of the prototype foamy virus envelope glycoprotein receptor-binding domain." J. Virol. 80(16): 8158-67.
- Stirnagel, K., **Lüftenecker, D.**, Stanke, N., Stange, A. and D. Lindemann. (in Vorbereitung). "Multiple autofluorescent-protein-tagged Foamy Virus particles: A new tool to study different processes of the retroviral replication cycle by modern imaging techniques."